

# **Untersuchungen zur Kinetik des $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanals und des $\text{Na}^{+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt im Fachbereich  
Chemische und pharmazeutische Wissenschaften  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von  
Andreas Haase  
aus Oldenburg

Frankfurt am Main  
2003  
(DF1)

vom Fachbereich Chemische und pharmazeutische Wissenschaften der Johann Wolfgang  
Goethe-Universität als Dissertation angenommen

Dekan:	Prof. Dr. Walter E. Müller
Gutachter:	Prof. Dr. Ernst Bamberg, Prof. Dr. Heinz Wässle
Datum der Disputation:	28.01.2003

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Transportprozesse an biologische Membranen . . . . .	1
1.1.1	Die Bedeutung von Calcium für die Zelle . . . . .	1
1.2	Der $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte Chloridkanal . . . . .	2
1.2.1	Eigenschaften der $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanäle . . . . .	4
	Elektrophysiologische Charakterisierung . . . . .	4
	Selektivität der $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanäle . . . . .	5
	Pharmakologische Eigenschaften . . . . .	5
	Regulation der $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanäle . . . . .	6
	Genfamilie . . . . .	7
1.3	Der $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher . . . . .	7
1.3.1	Physiologische Bedeutung des $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers . . . . .	7
1.3.2	Genfamilie . . . . .	8
1.3.3	Eigenschaften des $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers . . . . .	9
	Transportmodi, Stöchiometrie und Affinität . . . . .	9
	Transportmodelle . . . . .	10
	Transportraten und Elektrogenizität . . . . .	11
	Selektivität . . . . .	12
	Regulation . . . . .	12
	Inhibitoren . . . . .	13
1.3.4	Struktur des $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers NCX1 . . . . .	14
1.4	Das <i>Xenopus</i> -Expressionssystem . . . . .	16
1.4.1	Morphologie der <i>Xenopus</i> -Oozyte . . . . .	17
1.4.2	Eigenschaften als Expressionssystem . . . . .	17
1.4.3	Passive elektrische Eigenschaften der Oozytenmembran . . . . .	18
1.4.4	Endogene Transportproteine in der Oozytenmembran . . . . .	18
1.5	Die Patch-Clamp-Technik . . . . .	19
1.5.1	Grundlagen der Patch-Clamp-Technik . . . . .	19
1.5.2	Die Giant-Patch-Technik . . . . .	20
1.5.3	Messung von vorstationären Strömen an Kanälen und Transportern . . . . .	21
1.5.4	Photolyse von photolabilen Substraten . . . . .	22
1.6	Ziel der Arbeit . . . . .	23

<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>25</b>
2.1	Liste der Geräte und Materialien . . . . .	25
2.2	Heterologe Expression des $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ -Austauschers in <i>Xenopus</i> Oozyten . .	27
2.2.1	Klonierung des $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ -Austauschers aus dem Meerschweinchen-herzen . . . . .	28
2.2.2	Präparation der <i>Xenopus</i> Oozyten . . . . .	29
	Entnahme des Ovargewebes . . . . .	29
	Isolierung der Oozyten . . . . .	29
2.2.3	Injektion der mRNA in Oozyten . . . . .	29
2.3	Elektrophysiologische Untersuchungen mit der Patch-Clamp-Technik . . . .	30
2.3.1	Der Patch-Clamp-Messplatz . . . . .	30
	Beschreibung des Messplatzes . . . . .	30
	Herstellung der Patchpipetten . . . . .	32
	Herstellung der $\text{Ag}^+/\text{Ag}^+\text{-Cl}^-$ -Elektroden . . . . .	33
	Herstellung der Salzbrücken . . . . .	33
2.3.2	Durchführung eines Patch-Clamp-Experimentes an <i>Xenopus</i> Oozyten	33
	Vorbereitung der Oozyten . . . . .	33
	Durchführung des Patch-Clamp-Experimentes . . . . .	34
2.3.3	Elektrische Eigenschaften des Patch-Clamp-Messsystems . . . . .	35
2.3.4	Photolyse von DM-Nitrophen . . . . .	39
2.3.5	Datenerfassung und -analyse . . . . .	43
2.3.6	Verwendete Lösungen für die Patch-Clamp-Messungen . . . . .	45
	Übersicht über die verwendeten Lösungen . . . . .	47
<b>3</b>	<b>Messungen an den <math>\text{Ca}^{2+}</math>-aktivierten Chloridkanälen</b>	<b>50</b>
3.1	Stationäre Ströme im Lösungswechselexperiment . . . . .	50
3.2	Vorstationäre Ströme im Photolyseexperiment . . . . .	53
3.2.1	$\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit des vorstationären Chloridstroms . . . . .	55
3.2.2	Spannungsabhängigkeit des vorstationären Chloridstroms . . . . .	57
3.3	Vorstationäre Ströme im Spannungssprungexperiment . . . . .	60
<b>4</b>	<b>Messungen am heterolog exprimierten <math>\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}</math>-Austauscher</b>	<b>65</b>
4.1	Einführende Messungen am heterolog exprimierten $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ -Austauscher	65
4.2	Messungen im $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ -Austausch-Modus . . . . .	69
4.2.1	$\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit des einwärtsgerichteten $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ -Transports .	69
4.2.2	Spannungsabhängigkeit des einwärtsgerichteten $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ -Transports	75
4.3	Messungen im $\text{Ca}^{2+}\text{-Ca}^{2+}$ -Austausch-Modus . . . . .	81
4.3.1	$\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit des $\text{Ca}^{2+}\text{-Ca}^{2+}$ -Transports . . . . .	81
4.3.2	Spannungsabhängigkeit des $\text{Ca}^{2+}\text{-Ca}^{2+}$ -Transports . . . . .	83
4.4	Transport anderer zweiwertiger Kationen . . . . .	88
4.4.1	Vorstationäres Stromsignal im $\text{Sr}^{2+}\text{-Ca}^{2+}$ -Austausch . . . . .	89
	$\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit des vorstationären Stromsignals im $\text{Sr}^{2+}\text{-Ca}^{2+}$ -Austausch . . . . .	89

	Spannungsabhängigkeit des vorstationären Stromsignals im $\text{Sr}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch . . . . .	90
4.4.2	Vorstationäres Stromsignal im $\text{Ba}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch . . . . .	94
	Einfluss des freien $\text{Ca}^{2+}$ in der DM-Nitrophenlösung auf die Spannungsabhängigkeit des vorstationären Stromsignals	95
4.4.3	Kontrollmessungen bei niedrigen extrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentra- tionen . . . . .	97
4.5	Spannungssprungexperimente im $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch . . . . .	99
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>102</b>
5.1	Der endogene $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte Chloridkanal der <i>Xenopus</i> Oozytenmembran	102
5.1.1	Vergleich der Ergebnisse mit Literaturdaten . . . . .	102
	$\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprungexperimente am $\text{Ca}^{2+}$ -aktivier- ten Chloridkanal . . . . .	102
	Spannungssprungexperimente am $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chlo- ridkanal . . . . .	104
5.1.2	Folgerungen für ein <i>Gating</i> -Modell . . . . .	105
	Vergleich mit den <i>Large Conductance (MaxiK)</i> $\text{Ca}^{2+}$ -ak- tivierten $\text{K}^{+}$ -Kanälen . . . . .	112
	Reaktionsmodell nach Kuruma und Hartzell . . . . .	113
5.1.3	Ausblick . . . . .	115
5.2	Der heterolog exprimierte $\text{Na}^{+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher NCX1 . . . . .	117
5.2.1	Messungen im $\text{Na}^{+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch-Modus . . . . .	117
5.2.2	Messungen im $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch-Modus . . . . .	120
5.2.3	Transport anderer zweiwertiger Kationen und Einfluss der extrazel- lulären $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration . . . . .	121
5.2.4	Spannungssprungexperimente im $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch . . . . .	122
5.2.5	Folgerungen für ein Reaktionsmodell . . . . .	122
	Folgerungen aus dem $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch . . . . .	123
	Folgerungen aus dem $\text{Ba}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch . . . . .	133
	Simulation der Spannungssprungexperimente . . . . .	140
	Simulation des $\text{Na}^{+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschs . . . . .	142
5.2.6	Abschließende Bemerkungen . . . . .	149
	<b>Zusammenfassung</b>	<b>151</b>
	<b>Literatur</b>	<b>153</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>173</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>174</b>

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Transportproteine, die am Exzitations-Kontraktions-Zyklus beteiligt sind . . . . .	8
1.2	Reaktionsschemata des Transportmechanismus . . . . .	11
1.3	Topologie des $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher NCX1 . . . . .	15
1.4	Dreidimensionale Anordnung der Transmembransegmente des $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers . . . . .	16
1.5	Die Patch-Clamp-Messkonfigurationen und ihre Etablierung . . . . .	20
2.1	Der pNKS4-Vektor . . . . .	28
2.2	Darstellung des Patch-Clamp-Messplatzes . . . . .	31
2.3	Skizze der verwendeten Messanordnung . . . . .	32
2.4	Schaltbilder des Patch-Clamp-Vorverstärkers . . . . .	36
2.5	Ersatzschaltbild einer Patchpipette mit einem Membranpatch . . . . .	38
2.6	Eigenschaften eines 4-Pol-Bessel- und Butterworthfilters . . . . .	38
2.7	Photolyse-Reaktion von DM-Nitrophen . . . . .	40
2.8	Simulation eines $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrations sprungs durch Photolyse von DMN . . . . .	41
2.9	Absorptionsspektrum von DM-Nitrophen im Vergleich zum Fluoreszenzspektrum des Laserfarbstoffs BiBuQ . . . . .	42
2.10	Kalibrierungskurve der Farbstofflaserenergie . . . . .	42
2.11	Blockschaltbild der Messelektronik . . . . .	44
2.12	Fluo-3-Kalibrierungskurve . . . . .	46
3.1	Beispiel eines Lösungswechselexperiments an den $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanälen . . . . .	51
3.2	<i>Rundown</i> -Effekt auf die $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität der $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanäle . . . . .	52
3.3	$\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit des stationären Chlorid-Stromes . . . . .	52
3.4	Beispiel eines Stromsignals nach einem $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrations sprung mittels Photolyse von DM-Nitrophen . . . . .	53
3.5	Auswirkung des Signal-Rundowns auf den vorstationären Strom . . . . .	54
3.6	$\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit des vorstationären Chloridstroms . . . . .	56
3.7	$\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstante des Stromanstiegs . . . . .	57
3.8	Spannungsabhängigkeit des Spitzenstroms bei sättigender $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung mittels Photolyse . . . . .	58
3.9	Spannungsabhängigkeit des vorstationären Chloridstroms . . . . .	59
3.10	Spannungssprungexperiment bei nicht-sättigender $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration . . . . .	61
3.11	Spannungssprungexperiment bei sättigender $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration . . . . .	63

3.12 Spannungssprungexperiment bei symmetrischen Chloridkonzentrationen und sättigender $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration . . . . .	64
4.1 Beispiel eines Lösungswechselexperiments am heterolog exprimierten $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher . . . . .	65
4.2 Deregulation des $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers durch $\alpha$ -Chymotrypsin . . . . .	66
4.3 Intrazelluläre $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität des $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers im einwärtsgerichteten $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch-Modus . . . . .	67
4.4 Vorstationäre Ströme des $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers im $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ - und $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschmodus nach photolytischen $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprüngen . . . . .	68
4.5 Kontrollmessungen an nicht-injizierten Oozyten . . . . .	69
4.6 Vorstationäres Stromsignal des einwärtsgerichteten $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Transports bei verschiedenen $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen . . . . .	70
4.7 $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit des stationären $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Stromsignals . . . . .	71
4.8 $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit des Spitzenstromsignals im $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch . . . . .	72
4.9 $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten des Signalabfalls . . . . .	73
4.10 $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten des Signalanstiegs im $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch . . . . .	74
4.11 Spannungsprotokoll . . . . .	75
4.12 Vorstationäres Stromsignal des einwärtsgerichteten $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Transports bei verschiedenen Membranpotentialen und $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen . . . . .	76
4.13 Spannungsabhängigkeit des stationären Stromsignals bei verschiedenen $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen . . . . .	77
4.14 Spannungsabhängigkeit des Spitzenstromsignals bei verschiedenen $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen . . . . .	78
4.15 Spannungsabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten des Signalabfalls bei verschiedenen $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen . . . . .	79
4.16 Spannungsabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten des Signalanstiegs . . . . .	80
4.17 Vorstationäres Stromsignal bei verschiedenen $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen im $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch . . . . .	81
4.18 $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit des Spitzenstroms und der Geschwindigkeitskonstanten des Signalabfalls im $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch . . . . .	82
4.19 $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der verschobenen Ladung im $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch . . . . .	83
4.20 Das vorstationäre Stromsignal im $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch bei verschiedenen Membranpotentialen und $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen . . . . .	84
4.21 Spannungsabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten im $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch . . . . .	85
4.22 Spannungsabhängigkeit der apparenten $\text{Ca}^{2+}$ -Affinitäten des Spitzenstroms und der Geschwindigkeitskonstanten des Signalabfalls . . . . .	86
4.23 Spannungsabhängigkeit des Spitzenstroms im $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch . . . . .	87
4.24 Spannungsabhängigkeit der verschobenen Ladung im $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch . . . . .	87
4.25 $\text{Na}^+$ - $\text{Sr}^{2+}$ - und $\text{Na}^+$ - $\text{Ba}^{2+}$ -Austausch im Lösungswechselexperiment . . . . .	88
4.26 Vorstationäres Stromsignal bei verschiedenen $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen . . . . .	89

4.27	Ca <sup>2+</sup> -Abhängigkeit des Spitzenstroms und der Geschwindigkeitskonstanten im Sr <sup>2+</sup> -Ca <sup>2+</sup> -Austausch . . . . .	90
4.28	Spannungsabhängigkeit des Sr <sup>2+</sup> -Ca <sup>2+</sup> -Austauschs . . . . .	91
4.29	Spannungsabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten $1/\tau_{Abfall}$ bei verschiedenen Ca <sup>2+</sup> -Konzentrationen im Sr <sup>2+</sup> -Ca <sup>2+</sup> -Austausch . . . . .	91
4.30	Spannungsabhängigkeit der apparenten Ca <sup>2+</sup> -Affinitäten des Spitzenstroms und der Geschwindigkeitskonstanten des Signalabfalls im Sr <sup>2+</sup> -Ca <sup>2+</sup> -Austausch . . . . .	92
4.31	Spannungsabhängigkeit des Spitzenstroms im Sr <sup>2+</sup> -Ca <sup>2+</sup> -Austausch . . . . .	93
4.32	Spannungs- und Ca <sup>2+</sup> -Abhängigkeit der verschobenen Ladung im Sr <sup>2+</sup> -Ca <sup>2+</sup> -Austausch . . . . .	93
4.33	Vorstationäres Stromsignal im Ba <sup>2+</sup> -Ca <sup>2+</sup> -Austausch . . . . .	94
4.34	Spannungsabhängigkeit des vorstationären Stromsignals im Ba <sup>2+</sup> -Ca <sup>2+</sup> -Austausch bei zwei verschiedenen freien Ca <sup>2+</sup> -Konzentrationen vor der Photolyse . . . . .	96
4.35	Einfluss der extrazellulären Ca <sup>2+</sup> -Konzentration auf das vorstationäre Stromsignal im Ca <sup>2+</sup> -Ca <sup>2+</sup> -Austausch . . . . .	98
4.36	Spannungssprungexperiment im Ca <sup>2+</sup> -Ca <sup>2+</sup> -Austausch . . . . .	100
4.37	Spannungsabhängigkeit der im Spannungssprungexperiment bestimmten Geschwindigkeitskonstanten . . . . .	101
5.1	Simulation mit dem vorgeschlagenen Gating-Modell . . . . .	110
5.2	Simulation des Ca <sup>2+</sup> -aktivierten Chloridstroms mit dem Modell nach Kuruma und Hartzell . . . . .	114
5.3	Gating-Modell mit Anionen-abhängigen Reaktionsschritten . . . . .	116
5.4	Reaktionsschema des Ca <sup>2+</sup> -Ca <sup>2+</sup> -Austauschs mit 5 Zuständen . . . . .	124
5.5	Vergleich der experimentellen Stromsignale mit simulierten Stromsignalen . . . . .	130
5.6	Simulation des vorstationären Stromsignals mit dem 5-Zustandsmodell . . . . .	131
5.7	Zustandsverteilung bei einem simulierten Ca <sup>2+</sup> -Konzentrationssprungexperiment . . . . .	132
5.8	Simulation eines intrazellulären Ca <sup>2+</sup> -Konzentrationssprungs bei niedriger extrazellulärer Ca <sup>2+</sup> -Konzentration . . . . .	133
5.9	Reaktionsschema des Ca <sup>2+</sup> -Translokationszweiges mit 6 Zuständen . . . . .	135
5.10	Simulation des Ca <sup>2+</sup> -Ca <sup>2+</sup> -Austauschs mit dem 6-Zustandsmodell bei 100 $\mu$ M und 5 mM Ca <sup>2+</sup> extrazellulär . . . . .	137
5.11	Zustandsverteilung im 6-Zustandsmodell des Ba <sup>2+</sup> -Ca <sup>2+</sup> -Austauschs . . . . .	138
5.12	Simulation des vorstationären Stromsignals im Ba <sup>2+</sup> -Ca <sup>2+</sup> -Austausch mit dem 6-Zustandsmodell . . . . .	139
5.13	Simulation der Spannungssprungexperimente im Ca <sup>2+</sup> -Ca <sup>2+</sup> -Austausch . . . . .	141
5.14	Reaktionsschema des Na <sup>+</sup> Ca <sup>2+</sup> -Reaktionszyklus . . . . .	142
5.15	Simulation des vorstationären Stromsignals im Na <sup>+</sup> -Ca <sup>2+</sup> -Austausch mit dem 8-Zustandsmodell . . . . .	147



# Tabellenverzeichnis

1.1	Apparente Substrataffinitäten des $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers . . . . .	10
4.1	$\text{Ca}^{2+}$ -Affinitäten des stationären Stroms, des Spitzenstroms und der Geschwindigkeitskonstanten $1/\tau$ des Signalabfalls im $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch . .	73
4.2	$K_M$ -Werte des Spitzenstroms und der Geschwindigkeitskonstanten $1/\tau$ bei 0 mV im $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch . . . . .	83
4.3	t-Test-Analyse der mittleren Ladungsverschiebung im $\text{Ba}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ - und $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch . . . . .	95
5.1	Simulationsparameter des vorgeschlagenen Gating-Modells . . . . .	111
5.2	Fitparameter der Simulationen des 5-Zustandsmodells zum $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch . . . . .	129
5.3	Simulationsparametern für das 6-Zustandsmodell . . . . .	136
5.4	Differentialgleichungssystem des $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Transportzyklus . . . . .	143
5.5	Simulationsparameter des $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschs . . . . .	146



# Kapitel 1

## Einleitung

### 1.1 Transportprozesse an biologische Membranen

Lebende Zellen sind von einer Membran umgeben, die die Zelle von ihrer Umwelt abtrennt. Diese aus einer Doppelschicht von Lipiden, amphipathischen Molekülen, bestehende Membran ist praktisch impermeabel für Ionen und polare Moleküle. Um dennoch einen Austausch an Information, Energie und Stoffen mit der Umwelt zu ermöglichen, sind in die Membran Proteine ein- bzw. angelagert.

Die für den Stofftransport zuständigen Proteine werden dabei in drei wichtige Gruppen eingeteilt: Zu den *passiven* Transportproteinen zählen die Ionenkanäle. Durch die Ionenkanäle, die spannungsabhängig oder Liganden-gesteuert durchlässig für bestimmte Ionen werden können, erfolgt ein vektorieller Transport entsprechend dem elektrochemischen Gradienten. Die *primär aktiven* Transportproteine, auch Pumpen genannt, können gegen den elektrochemischen Gradienten Ionen oder Moleküle transportieren. Hierzu verbrauchen sie Energie in Form von ATP. Diese molekularen Pumpen erhalten letztendlich den elektrochemischen Gradienten aufrecht, den die Zelle zum Leben benötigt. So sorgt z.B. die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase für eine höhere extrazelluläre  $\text{Na}^+$ -Konzentration und eine höhere intrazelluläre  $\text{K}^+$ -Konzentration. Der dadurch aufrechterhaltene  $\text{Na}^+$ -Gradient dient dann für viele *sekundär aktive* Transportproteine als treibende Kraft, Substrate gegen ein Konzentrationsgefälle transportieren zu können. Bei den *sekundär aktiven* Transportern unterscheidet man Cotransporter und Austauscher. Cotransporter, wie z.B. der  $\text{Na}^+$ -Glukose-Cotransporter, transportieren das Substrat zusammen mit den  $\text{Na}^+$ -Ionen längs des  $\text{Na}^+$ -Gradienten in die Zelle, während Austauscher, wie z.B. der  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher, das Substrat unter Ausnutzung des  $\text{Na}^+$ -Gradienten entgegengesetzt zu den  $\text{Na}^+$ -Ionen aus der Zelle heraus bzw. hinein transportieren.

#### 1.1.1 Die Bedeutung von Calcium für die Zelle

Calcium ist noch vor cAMP der häufigste intrazelluläre Mediator (Alberts et al., 1997). Intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  bindet z.B. an  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Proteine wie Calmodulin, die wichtige  $\text{Ca}^{2+}$ -regulierte Prozesse in der Zelle vermitteln. Daneben kann das intrazelluläre freie  $\text{Ca}^{2+}$  auch direkt  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Proteine aktivieren.

Die intrazelluläre freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ist im Vergleich zur Konzentration anderer Ionen relativ niedrig: Im Ruhezustand der Zelle ist sie intrazellulär  $\leq 100 \text{ nM}$ , extrazellulär dagegen  $\approx 1 \text{ mM}$  und damit etwa 10000mal höher als intrazellulär. Allerdings liegt die totale intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration deutlich höher (ca.  $2 \text{ mM}$ ), da der Großteil des Calciums nicht als freies  $\text{Ca}^{2+}$  im Cytosol vorliegt. So dient z.B. das endoplasmatische Retikulum (ER) als wichtiger intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher (Campbell, 1983).

Durch den Einstrom von Calcium in das Cytosol kann es zu einer drastischen Erhöhung der lokalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration kommen, die zu einer Aktivierung  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Proteine in der Zelle führt. Es gibt dabei zwei wichtige  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Signalwege: Zum einen kann eine Depolarisation der Zellmembran zum Öffnen spannungsabhängiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle führen, so dass  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zelle einströmt (sogenannter *kapazitiver*  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom). Zum anderen können extrazelluläre Signalmoleküle an G-Protein-gekoppelte Oberflächenrezeptoren binden, die wiederum eine Hydrolyse von Phosphatidylinositol-Bisphosphat ( $\text{PIP}_2$ ) zu Inositol-1,4,5-trisphosphat ( $\text{IP}_3$ ) vermitteln. Das  $\text{IP}_3$  wiederum bindet an ryanodinische Rezeptoren am ER, so dass  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem ER über  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle in das Cytosol strömt und zu einer weiteren lokalen Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führt (sogenannter *store-operated*  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom, Berridge, 1995, Parekh und Penner, 1997).

Ebenso wie das ER dient auch das sarkoplasmatische Retikulum (SR) als intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher. Eine Depolarisation der Plasmamembran führt über T-Tubuli zu einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausschüttung über  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle aus dem SR. Dieser erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel kann wiederum zum Binden von  $\text{Ca}^{2+}$  an Ryanodin-Rezeptoren am SR führen. Als Folge dessen werden weitere  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle geöffnet. Ein solcher positiver Rückkopplungseffekt findet sich auch im ER. Dieser Signalweg spielt z.B. eine wichtige Rolle in Muskelzellen, da das aus dem SR freigesetzte  $\text{Ca}^{2+}$  an ein Troponin-Protein bindet, welches dann die Muskelkontraktion vermittelt (Alberts et al., 1997).

Durch die oben beschriebenen Wege steigt die freie intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf mehrere Mikromol/l an. Eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von mehr als  $10 \mu\text{M}$  ist allerdings auf Dauer für die Zelle schädlich, so dass das in das Cytosol eingeströmte  $\text{Ca}^{2+}$  wieder entfernt werden muss. Hierfür dient zum einen die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in der Plasmamembran und der Membran des ER und SR. Zum anderen spielt besonders in Muskel- und Nervenzellen der  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher in der Plasmamembran eine wichtige Rolle zur Extrusion intrazellulären Calciums. Bei sehr hohen intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen wird zudem  $\text{Ca}^{2+}$  über eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpe in die Mitochondrien transportiert (Egger und Niggli, 1999, Blaustein und Lederer, 1999).

Weitergehende Details sind in zahlreichen Übersichtsarbeiten und Büchern zu finden (Campbell, 1983, Clapham, 1995, Berridge, 1995, Parekh und Penner, 1997, Putney, 2000).

## 1.2 Der $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte Chloridkanal

Bei dem  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanal handelt sich um einen durch intrazelluläres Calcium gesteuerten Anionenkanal, der eine hohe Permeabilität für Chlorid besitzt. Da die normale intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von  $\leq 100 \text{ nM}$  für eine Aktivierung des Chlo-

ridkanals nicht ausreicht, führt erst ein Ansteigen der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zum Öffnen des Kanals. Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsanstieg erfolgt dabei entweder über einen kapazitiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle in der Plasmamembran oder über eine Ausschüttung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus den intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher über den  $\text{IP}_3$ -Weg (Parekh und Penner, 1997) .

Durch intrazelluläres Calcium aktivierte Chloridkanäle wurden erstmals von Bader et al. (1982) in Sebstäbchenzellen der Salamanderretina beschrieben. Mittlerweile wurden sie in zahlreichen Gewebetypen gefunden, wo sie wichtige Rollen bei den zellulären Funktionen übernehmen.

In Herzmuskelzellen sind  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte Chloridkanäle z.B. an der Repolarisation des Aktionspotentials im Exzitations-Kontraktionszyklus beteiligt (Zygmunt, 1994); in Nervenzellen modulieren sie die neuronale Erregbarkeit (Currie et al., 1995, De Castro et al., 1997). In Zellen der glatten Muskulatur sind  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte Chloridkanäle für spontane, transiente Einwärtsströme, die sogenannten STICs (*spontaneous transient inward currents*), verantwortlich, die durch spontane Ausschüttung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern ausgelöst werden und zu einer Depolarisation der Membran führen (Hogg et al., 1993, Janssen und Sims, 1994). Diese STICs sind dabei meist zeitlich mit transienten Auswärtsströmen, den sogenannten STOCs (*spontaneous transient outward currents*), gekoppelt. Die STOCs werden durch  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte Kaliumkanäle hervorgerufen, die im Gegensatz zu den STICs zu einer Hyperpolarisation der Membran führen. Daneben wurden  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte Chloridkanäle insbesondere in sekretorischen Zelltypen wie Tränendrüsen (Marty et al., 1984, Evans und Marty, 1986), Darmepithelzellen (Cliff und Frizzell, 1990, Morris und Frizzell, 1993) und Speicheldrüsen (Arreola et al., 1996) gefunden, wo sie an der Chlorid-Sekretion beteiligt sind. (Für eine Übersicht siehe Kidd und Thorn, 2000).

Die Plasmamembran der *Xenopus* Oozyte enthält ebenfalls einen  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanal (Barish, 1983, Miledi und Parker, 1984). In der Oozyte spielen die  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanäle eine wichtige Rolle bei der Ausbildung des Fertilisationspotentials (Young et al., 1984). Durch eine Depolarisation der Eizellenmembran wird eine Polyspermie verhindert (Jaffe und Cross, 1986). Die Depolarisation wird durch eine erhöhte Chloridpermeabilität hervorgerufen und kann bis zu 20 Minuten andauern (Jaffe et al., 1985). Der genaue Vorgang, der zur Ausbildung dieses Fertilisationspotentials führt, ist noch ungeklärt. Vermutlich werden bei der Verschmelzung des Spermiums mit der Eizellenmembran G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktiviert, die über den  $\text{IP}_3$ -Weg zur Ausschüttung von Calcium aus den internen  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern führen (Kline et al., 1988). Insbesondere die Beteiligung einer Hyaluronaseaktivität bei der Verschmelzung des Spermiums mit der Eizellenmembran wird in diesem Zusammenhang diskutiert, da gezeigt werden konnte, dass Hyaluranon die  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanäle aktiviert (Fraser, 1997). Die Ausbreitung einer Calcium-Welle nach dem Eindringen eines Spermiums in eine *Xenopus* Eizelle konnte mit  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffen und der konfokalen Mikroskopie tatsächlich beobachtet werden (Fontanilla und Nuccitelli, 1998).

Trotz der großen Gewebediversität, in denen  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte Chloridkanäle gefunden wurden, ähneln sie sich oftmals stark in ihren Eigenschaften.

### 1.2.1 Eigenschaften der $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanäle

#### Elektrophysiologische Charakterisierung

Beinahe allen bekannten  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanälen ist eine sehr hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität gemein. Der  $K_D$ -Wert für  $\text{Ca}^{2+}$  liegt meist unter  $1\ \mu\text{M}$ : Für die  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanäle der *Xenopus* Oozyte haben Qu und Hartzell (2000) einen  $K_D$  von 280 nM bei 0 mV bestimmt. In der gleichen Größenordnung liegen z.B. die  $K_D$ -Werte für  $\text{Ca}^{2+}$  der  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanäle aus Leberzellen (Koumi et al., 1994), Ohrspeicheldrüsen (Arreola et al., 1996) und Pankreaszellen (Kidd und Thorn, 2001). Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität zeigt dabei eine starke Spannungsabhängigkeit: Bei +150 mV beträgt der  $K_D$ -Wert für  $\text{Ca}^{2+}$  100 nM, bei -100 mV 450 nM (Werte für  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte Chloridkanäle in *Xenopus* Oozyten, Qu und Hartzell, 2000). Ähnliche Spannungsabhängigkeiten des  $K_D$ -Wertes wurden auch in anderen Geweben gefunden (Arreola et al., 1996). Diese zunehmende  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität bei Depolarisation führt zu einer Auswärtsgleichrichtung des Stromsignals, die bei subsättigenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen dementsprechend am deutlichsten ausfällt.

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit lässt sich nicht mit einer einfachen Michaelis-Menten-Funktion (Hill-Koeffizient=1) anpassen. Der Hill-Koeffizient wurde von Kuruma und Hartzell (2000) zu  $n=3.2$  (bei -120 mV) bzw.  $n=2.5$  (bei +120 mV) bestimmt und ist damit nur sehr schwach spannungsabhängig (Werte für *Xenopus*-CLCA). Im Gegensatz dazu haben Arreola et al. (1996) für die  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanäle in Ohrspeicheldrüsen einen stärker spannungsabhängigen Hillkoeffizienten gefunden:  $n=1.2$  bei -66 mV bzw.  $n=2.7$  bei +74 mV.

Bei der Einzelkanalleitfähigkeit gibt es Abweichungen zwischen den verschiedenen Gewebetypen. Während für den CLCA der *Xenopus* Oozyte eine Einzelkanalleitfähigkeit von 3 pS bestimmt wurde (Takahashi et al., 1987), reichen die Werte in anderen Zelltypen von 1–2 pS (Tränendrüsen, Marty et al., 1984 und Muskelzellen, Van Renterghem und Lazdunski, 1993), über 7.4 pS (Leberzellen, Koumi et al., 1994) bis 13–16 pS (HT-29-Zellen, Morris und Frizzell, 1993). Takahashi et al. (1987) haben für den  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanal der Oozyte eine mittlere Offenzeit von  $\approx 100$  ms gemessen, allerdings flickert der Kanal mit hoher Frequenz (Qu und Hartzell, 2000), was auf das Auftreten von sogenannten *Bursts* hindeutet.

Bei der Mehrzahl der  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanäle wurde eine langsame Aktivierung ( $\tau_{\text{akt.}}$  bis einige 100 ms) bei einer Depolarisation des Membranpotentials beobachtet. Diese langsame Aktivierung ist  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig: je höher die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, desto schneller erfolgt die Aktivierung.

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanäle der *Xenopus* Oozyte weisen bei Ganzzellmessungen ein besonderes kinetisches Verhalten auf. Bei Aktivierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanäle über eine Permeabilisierung der Membran mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor A23187 zeigt sich eine biphasische Kinetik (Boton et al., 1989): Einem schnell (innerhalb einer Minute) abfallenden transienten Signal folgt ein langsam inaktivierendes Stromsignal. Dieses biphasische Verhalten wurde auf zwei verschiedene Chloridkanalpopulationen zurückgeführt (Hartzell, 1996, Machaca und Hartzell, 1998). Bei Messungen am isolierten Membranpatch wurden bisher allerdings keine Hinweise auf zwei Kanalpopulationen gefun-

den (Gomez-Hernandez et al., 1997, Kuruma und Hartzell, 2000). Diese biphasische Kinetik ist daher wahrscheinlich auf komplexe  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsgradienten zwischen Plasmamembran und Cytosol zurückzuführen, wie Messungen mit  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffen gezeigt haben (Machaca und Hartzell, 1999).

### Selektivität der $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanäle

Der  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte Chloridkanal ist nicht nur für Chlorid permeabel, sondern auch für eine Vielzahl weiterer Anionen. Qu und Hartzell (2000) haben ausführlich die Permeabilität des endogenen  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanals in der *Xenopus* Oozyte für andere Anionen neben Chlorid untersucht. Dabei haben sie folgende relative (bezogen auf Chlorid) Permeabilitätssequenz gefunden:  $\text{C}(\text{CN})_3^- > \text{SCN}^- > \text{N}(\text{CN})_2^- > \text{ClO}_4^- > \text{I}^- > \text{NO}_3^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{COOH (Formiat)} > \text{HCO}_3^- > \text{Acetat} = \text{F}^- > \text{Gluconat}$ . Diese Permeabilitätssequenz wurde auch für  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte Chloridkanäle aus Tränendrüsenzellen gefunden (Evans und Marty, 1986), während sich für Speicherdrüsenzellen des Schafes eine leicht veränderte Reihenfolge ergab (Ishikawa und Cook, 1993).

Für die relativen Leitfähigkeiten ergab sich eine abweichende Reihenfolge, so dass Qu und Hartzell aus dem Verhältnis der relativen Permeabilitäten zu den relativen Leitfähigkeiten eine relative Affinitätssequenz der Kanalpore für das permeierende Anion aufgestellt haben:  $\text{C}(\text{CN})_3^- > \text{SCN}^- = \text{ClO}_4^- > \text{N}(\text{CN})_2^- > \text{F}^- > \text{I}^- > \text{NO}_3^- > \text{Br}^- > \text{HCO}_3^- > \text{Cl}^- > \text{Gluconat} > \text{COOH (Formiat)} > \text{Acetat}$ . Diese relativen Affinitäten deuten auf eine Bindung des Anions an eine Bindungsstelle in der Kanalpore hin.

Neben der Anionenpermeabilität haben Qu und Hartzell auch eine schwache Permeabilität für  $\text{Na}^+$ -Ionen gefunden ( $P_{\text{Na}}/P_{\text{Cl}} = 0.1$ ). Die Kanalpore ist demnach auch für Kationen durchlässig.

### Pharmakologische Eigenschaften

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanäle werden von typischen Chloridkanalblockern gehemmt. Blocker, die spezifisch nur die  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanäle hemmen, sind bisher nicht bekannt. Potente Blocker sind Niflumic acid (NFA) und Flufenamic acid (FFA) mit einem  $K_i$  von 17 bzw. 28  $\mu\text{M}$  für die CLCA in *Xenopus* Oozyten (White und Aylwin, 1990). Der Block durch NFA und FFA ist reversibel und spannungsunabhängig (White und Aylwin, 1990).

NPPB (5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino)-benzoat) ist ebenfalls ein potenter Blocker mit einem  $K_i$  von ca. 50  $\mu\text{M}$  (Wu und Hamill, 1992). Der NPPB-Block ist spannungsabhängig, was darauf hindeutet, dass das negativ geladene NPPB in der offenen Kanalpore innerhalb der Membran hemmt (Wu und Hamill, 1992). Ein solcher spannungsabhängiger Block wurde ebenfalls für Anthracene-9-carboxylic acid (A9C), Diphenylamin-2-carboxylic acid (DPC) und 4, 4'-diisothiocyano-stilbene-2, 2'-disulfonic acid (DIDS) gefunden (Qu und Hartzell, 2001). Ein spannungsabhängiger Block der  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanäle durch DIDS, A9C, NPPB, DPC und IAA-94 wurde auch für  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte Chloridkanäle in Acinarzellen der Unterkieferdrüsen der Ratte gefunden (Ishikawa, 1996).

Glibenclamid, ein CFTR-Chloridkanalblocker, zeigte dagegen keine hemmende Wirkung auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanäle (Ishikawa, 1996). Ein schwach spannungsabhängiger Block zeigte sich bei extrazellulärer Applizierung von Furosemid ( $K_i = 1 \text{ mM}$  bei  $+20 \text{ mV}$ ) auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte Chloridkanäle der Tränendrüsenzellen der Ratte (Evans et al., 1986).

## Regulation der $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanäle

Eine Regulation der  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanäle erfolgt über zahlreiche zelluläre Faktoren.

Eine wichtige Rolle bei der oftmals beobachteten Inaktivierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanäle spielt die Phosphokinase C (PKC), die den kapazitiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom reguliert (Petersen und Berridge, 1994). Boton et al. (1990) konnten durch Applizierung des PKC-Inhibitors H-7 die Inaktivierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanäle in *Xenopus* Oozyten aufheben. Ebenso beeinflusst die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Kinase II (CaM KII) die Aktivität der  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanäle (Chan et al., 1994, Wang und Kotlikoff, 1997, Chan et al., 2000, Kidd und Thorn, 2000).

Die intrazelluläre Applizierung von ATP führt zu einer vierfachen höheren Aktivierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanäle am *excised*-Makropatch von *Xenopus* Oozyten (Hilgemann, 1997). Dabei führte auch die Verwendung nicht hydrolysierbarer ATP-Analoga (z.B. AMP-PNP, ATP- $\gamma$ S) zu einer Stimulierung der Kanäle (Ishikawa, 1996, Hilgemann, 1997), so dass eine direkte Phosphorylierung des Kanal wahrscheinlich nicht stattfindet. Diese ATP-Stimulation ist eventuell nur auf das Binden von Metallionen wie Aluminium, die als Verunreinigungen in den Lösungen vorkommen, zurückzuführen (Hilgemann, 1997).

Desweiteren führt ein niedriger pH-Wert ( $< \text{pH } 7$ ) zu einer Inhibierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanäle (Arreola et al., 1995, Kidd und Thorn, 2000). Der genaue Mechanismus hierzu ist noch nicht bekannt.

Eine Regulation der  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanäle durch den CFTR-Chloridkanal (Kunzelmann et al., 1997, Wei et al., 2001) findet wahrscheinlich nicht statt, sondern ist vielmehr auf inadequate Messbedingungen zurückzuführen (Nagel et al., 2001).

Das permeierende Anion reguliert ebenfalls den Chloridkanal, indem es vermutlich in der Kanalpore bindet und so die Affinität des Kanals für  $\text{Ca}^{2+}$  beeinflusst: Der  $K_D$ -Wert für  $\text{Ca}^{2+}$  liegt für Chlorid als permeierendes Anion bei  $280 \text{ nM}$  (bei  $0 \text{ mV}$ ), für  $\text{SCN}^-$  dagegen bei  $130 \text{ nM}$  (Qu und Hartzell, 2000). Das Vorhandensein von extrazellulären Anionen ist möglicherweise für das Kanalöffnen notwendig (Centinaio et al., 1997). Qu und Hartzell (2000) haben zudem Hinweise gefunden, dass es zwei Bindungsstellen für Anionen in der Pore gibt, so dass sich die gebundenen Anionen möglicherweise gegenseitig beeinflussen. Allerdings haben sie keinen sicheren Hinweis für ein anomales Molenbruch-Verhalten gefunden.



## Genfamilie

Mittlerweile wurden acht  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte Chloridkanäle geklont, die untereinander eine große Ähnlichkeit (67-89%) in ihrer Aminosäuresequenz aufweisen.

1995 wurde der bCLCA1, ein epithelialer Chloridkanal aus der Rinderluftröhre, von Cunningham et al. kloniert (Cunningham et al., 1995). Im Vergleich zu den ClC-Chloridkanälen besitzt der bCLCA1 nur 40% Homologie. Lu-ECAM1 (Lung endothelial cell adhesion molecule-1) besitzt 88% Identität zu bCLCA1 und wurde 1997 von Elble et al. aus Endothelzellen der Rinderaorta geklont (Elble et al., 1997). mCLCA1 wurde aus dem Lungengewebe der Maus kloniert (Gandhi et al., 1998). mCLCA2 stammt aus dem Brustdrüsengewebe der Maus und mCLCA3 (vormals Gob-5) aus Becherzellen des Darmgewebes (Lee et al., 1999, Komiya et al., 1999). Die in humanem Gewebe gefundenen Mitglieder der CLCA-Familie, hCLCA1 (Darmepithel), hCLCA2 (Lunge, Luftröhre und Brustdrüse) und hCLCA3 (Lunge, Luftröhre, Milz, Thymus) wurden von Gruber und Mitarbeitern kloniert (Gruber et al., 1998, Gruber et al., 1999, Gruber und Pauli, 1999).

Die heterolog exprimierten Proteine werden durch typische Chloridkanalblocker wie DIDS und NFA, aber auch durch DTT, gehemmt. Bei elektrophysiologischen Messungen zeigen die Ströme eine Auswärts-Gleichrichtung. Es ist allerdings unklar, ob diese klonierten  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanäle und die bisher in der Literatur beschriebenen  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanäle, insbesondere der endogene CLCA in der *Xenopus* Oozytenmembran, zur gleichen (Unter-)Familie gehören. Vermutlich bilden die bisher klonierten CLCA zumindest eine eigene Unterfamilie, da sie sich in ihrem Verhalten z.T. deutlich von anderen  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanälen unterscheiden (Papassotiriou et al., 2001). So zeigen die klonierten CLCA z.B. keine langsame Aktivierung bei einer Depolarisation der Membran, ein Verhalten, das bei sehr vielen  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanälen beobachtet wurde. Ebenso ist der Block durch DTT sehr untypisch.

## 1.3 Der $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher

### 1.3.1 Physiologische Bedeutung des $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers

Der  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher ist ein sekundär aktiver Transporter, der  $\text{Ca}^{2+}$  unter Ausnutzung des  $\text{Na}^+$ -Gradienten aus der Zelle heraus bzw. in die Zelle hinein transportiert. Die Transportrichtung hängt vom elektrochemischen Potential ab. Im Gegensatz zu Cotransportern wird das  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion entgegengesetzt zum  $\text{Na}^+$ -Ion transportiert.

Der  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher spielt neben den  $\text{Ca}^{2+}$ -selektiven Kanälen und der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase eine wichtige Rolle in der Regulierung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalts der Zelle. Im Vergleich zur  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase hat der  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher eine 10fach niedrigere Affinität, aber eine 10 bis 50fach höhere Transportrate (*Turnover*, Blaustein und Lederer, 1999). In der Plasmamembran von Herzmuskelzellen kommt der  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher in einer Dichte von 250-400 Austauschermoleküle pro  $\mu\text{m}^2$  vor. Die Expressionsdichte ist damit 4-6mal niedriger als die der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase (Hilgemann et al., 1991, Blaustein und Lederer, 1999).

Durch die hohe Transportrate kann der  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher schnell große Mengen an  $\text{Ca}^{2+}$  aus der Zelle transportieren. Insbesondere beim Exzitations-Kontraktions-Zyklus

des Herzmuskels spielt der Austauscher eine wichtige Rolle: Während des Exzitations-Kontraktions-Zyklus kommt es in der Depolarisationsphase zu einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über die L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle in die Herzzelle. Dieses eingeströmte  $\text{Ca}^{2+}$  führt zu einer Ausschüttung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem sarkoplasmatischen Retikulum in das Cytosol und löst damit letztendlich die Kontraktion des Muskels aus. Der  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher ist dann, zusammen mit der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase der Plasmamembran und der SR- $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, für die Extrusion des zuvor eingeströmten Calciums während der Repolarisationsphase verantwortlich (ten Eick et al., 1992, Blaustein und Lederer, 1999, Priori et al., 1999).

Die Bedeutung des  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers spiegelt sich auch in der großen Anzahl an Publikationen wieder. Eine sehr umfangreiche Übersichtsarbeit wurde von Blaustein und Lederer (1999) veröffentlicht.

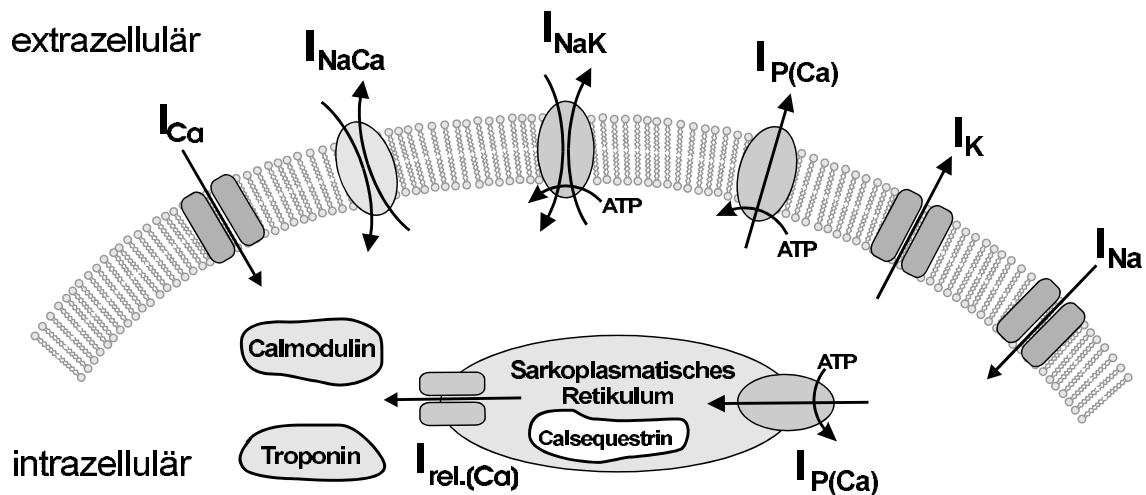


Abbildung 1.1: Transportproteine, die am Exzitations-Kontraktions-Zyklus beteiligt sind  
 $I_{\text{Na}}$ : schnelle  $\text{Na}^+$ -Kanäle führen zur Depolarisation der Zelle;  $I_{\text{Ca}}$ :  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (L-Typ, T-Typ),  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über die L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle führt zum  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Austrom aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum über  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle ( $I_{\text{rel.(Ca)}}$ );  $I_{\text{K}}$ :  $\text{K}^+$ -Kanäle (einwärts gleichrichtende und spannungsabhängige  $\text{K}^+$ -Kanäle) sind für die Repolarisation der Zelle verantwortlich;  $I_{\text{NaCa}}$ :  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher und  $I_{\text{P(Ca)}}$ :  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase der Sarkolemma bzw. SR- $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase sind für die Extrusion des eingeströmten  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Cytosol verantwortlich;  $I_{\text{NaK}}$ :  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase: Aufrechterhaltung des  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ -Gradienten; Calmodulin, Troponin, Calsequestrin:  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher der Zelle (verändert nach Priori et al., 1999)

### 1.3.2 Genfamilie

Die bis heute bekannten  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher sind hauptsächlich drei Genfamilien zuzuordnen: NCX1 (Nicoll et al., 1990), NCX2 (Li et al., 1994) und NCX3 (Nicoll et al., 1996). Die Gene weisen alle ähnliche Hydropathizitätsprofile auf, so dass Struktur- und Sequenzidentität naheliegen. Zudem besitzen sie große funktionelle Ähnlichkeiten (Linck et al., 1998). Der NCX1 wird vor allem im Herzen, aber auch im Gehirn, Niere, Lunge, Pankreas, Milz und Skelettmuskel exprimiert, NCX2 und NCX3 wurden dagegen bisher nur im Gehirn und Skelettmuskel gefunden (Blaustein und Lederer, 1999).

Als wichtiger Schritt in der  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher-Forschung gilt die Klonierung des NCX1-Austauschergens aus dem Hundeherzen 1990 durch Nicoll et al. (1990). Homologe NCX1-Gene wurden danach auch aus zahlreichen weiteren Säugergeweben kloniert, unter anderem der humane NCX1 (Komuro et al., 1992) und der Meerschweinchen-NCX1 (Tsuruya et al., 1994). Daneben wurden weitere  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher aus nicht-Säugergeweben kloniert, die dennoch eine große Ähnlichkeit aufweisen, unter anderem der *Xenopus*-fNCX1b (Iwata et al., 1996), der *Drosophila*-NCX (Dmel/Nck) (Ruknudin et al., 1997), der Tintenfisch-NCX-SQ1 (He et al., 1998) und der Forelle-NCX-TR1 (Xue et al., 1999). Desweiteren wurden bis heute mindestens 32 Spleißvarianten des NCX1-Genprodukts gefunden (Kofuji et al., 1994, Schulze et al., 1996, Blaustein und Lederer, 1999).

In den Sehtäbchenzellen der Retina wurde ein weiterer  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher gefunden, der neben  $\text{Na}^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$  auch  $\text{K}^+$  transportiert und als NCKX bezeichnet wird (Cervetto et al., 1989, Schnetkamp et al., 1989). Das erste NCKX-Gen wurde 1992 von Reiländer et al. aus der Rinderretina kloniert. Mittlerweile sind weitere Mitglieder der NCKX-Familie kloniert und exprimiert worden (Tsoi et al., 1998, Cooper et al., 1999, Kimura et al., 1999, Prinsen et al., 2000).

### 1.3.3 Eigenschaften des $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers

#### Transportmodi, Stöchiometrie und Affinität

Unter physiologischen Bedingungen (140 mM  $\text{Na}^+$  und 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  extrazellulär, 8 mM  $\text{Na}^+$  und 1  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  intrazellulär und bei negativem Membranpotential) findet ein Austausch von extrazellulärem  $\text{Na}^+$  gegen intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  statt. Der Transport erfolgt dabei mit einer Stöchiometrie von 3  $\text{Na}^+$  : 1  $\text{Ca}^{2+}$  mit dem  $\text{Na}^+$ -Gradienten und dem Membranpotential als treibende Kraft (Pitts, 1979, Reeves und Hale, 1984, Kimura et al., 1986, Ehara et al., 1989, Crespo et al., 1990). Allerdings wurde in der Vergangenheit ebenfalls eine 4:1-Stöchiometrie diskutiert (Mullins, 1979) und wird auch von Fujioka et al. (2000) und Dong et al. (2002) nach neueren Messungen des Umkehrpotentials wieder favorisiert. Desweiteren wird auch eine variable Stöchiometrie in Betracht gezogen (Mullins, 1991).

Bei Umkehrung des elektrochemischen Gradienten kann der  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher auch im sogenannten reversen Modus laufen, bei dem intrazelluläres  $\text{Na}^+$  gegen extrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  unter Beibehaltung der 3:1-Stöchiometrie ausgetauscht wird (Baker et al., 1969, Reeves und Sutko, 1983). Eine mögliche physiologische Relevanz des reversen Modus ist unklar.

Neben dem Heteroaustausch von  $\text{Na}^+$  gegen  $\text{Ca}^{2+}$  konnten bei Tracer-Flux-Messungen auch Homoaustausch-Transportmodi beobachtet werden, bei denen  $\text{Ca}^{2+}$  gegen  $\text{Ca}^{2+}$  bzw.  $\text{Na}^+$  gegen  $\text{Na}^+$  ausgetauscht werden (Blaustein und Russell, 1975, Bartschat und Lindenmayer, 1980, Slaughter et al., 1983). Da dieser Homoaustausch elektroneutral ist, kann bei elektrophysiologischen Messungen kein stationärer Strom registriert werden.

Die Affinität des  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers für  $\text{Ca}^{2+}$  bzw.  $\text{Na}^+$  hängt von der *trans*-Konzentration des jeweiligen Gegenions ab: Je höher die *trans*-Konzentration des Gegenions ist, desto niedriger ist die Affinität des Austauscher für  $\text{Na}^+$  bzw.  $\text{Ca}^{2+}$  (Matsuoka und Hilgemann, 1992). Die von Matsuoka und Hilgemann (1992) und Kappl (1997) bestimm-

Bindungsstelle	$\text{Ca}^{2+}$	$\text{Na}^+$
intrazellulär	$6.9 \mu\text{M}^{1)}$	$18.6 \text{ mM}^{2)}$
	$4.1 \mu\text{M}^{3)}$	—
extrazellulär	$320 \mu\text{M}^{4)}$	$118 \text{ mM}^{5)}$

Tabelle 1.1: Apparente Substrataffinitäten des  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers

Apparente Substrataffinitäten des  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers bei einem Membranpotential von 0 mV, Konzentration des Gegenions auf der *trans*-Seite: <sup>1)</sup> 150 mM  $\text{Na}^+$ , <sup>2)</sup> 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , <sup>3)</sup> 100 mM  $\text{Na}^+$ , <sup>4)</sup> 90 mM  $\text{Na}^+$ , <sup>5)</sup> 5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  (nach Matsuoka und Hilgemann (1992) und Kappl (1997))

ten apparenten Affinitäten des NCX1 aus dem Meerschweinchenherzen sind in Tabelle 1.1 zusammengefasst. Die apparenten Affinitäten zeigen eine deutliche Asymmetrie des Austauschers zwischen der extrazellulären und der zytoplasmatischen Seite.

## Transportmodelle

In Abbildung 1.2 sind die beiden diskutierten Transportmechanismen des  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers dargestellt. Der simultane Austausch (Abb. 1.2A), bei dem die transportierten Ionen von beiden Seiten der Membran an den Austauscher binden und dann gleichzeitig über die Membran transloziert werden, wurde zunächst von Blaustein und Santiago (1977) diskutiert. Hauptargument für einen simultanen Austausch war die beobachtete Unabhängigkeit des extrazellulären  $K_M$ -Wertes für  $\text{Na}^+$  von der internen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (Blaustein und Santiago, 1977, Ledvora und Hegyvary, 1983, Li und Kumura, 1990). Eine solche Abhängigkeit des  $K_M$ -Wertes von der Konzentration des Gegenions auf der *trans*-Seite der Membran wurde aber später von mehreren Gruppen gefunden und daher ein konsekutiver Austausch vorgeschlagen (Khananshvoli, 1990, Hilgemann et al., 1991, Li und Kimura, 1991, Matsuoka und Hilgemann, 1992). Bei einem solchem konsekutiven oder *ping-pong* Mechanismus bindet zunächst ein Ion an den Austauscher und wird auf die andere Membranseite transloziert. Nach der Dissoziation des Ions kann nun das entsprechende Gegenion binden und der Austauscher transportiert es auf die Gegenseite der Membran. Die Translokation der Ionen erfolgt hier also nacheinander. Bei einer Verringerung der Konzentration des Gegenions auf der *trans*-Seite ( $c_{trans} \rightarrow 0$ ) sollte der  $K_{M,cis}$ -Wert des Ions auf der *cis*-Seite der Membran verschwinden, während beim simultanen Austausch der  $K_{M,cis}$ -Wert dagegen für  $c_{trans} \rightarrow 0$  einen konstanten Wert größer null annehmen sollte (Läuger, 1987).

Für einen konsekutiven Austausch spricht auch das von Niggli und Lederer (1991) und Kappl und Hartung (1996a, 1996b) beobachtete vorstationäre Stromsignal nach einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung durch Photolyse von DM-Nitrophen. Um dieses vorstationäre Signal mit einem simultanen Austausch erklären zu können, müsste das Austauschschema um einen zusätzlichen Membran-querenden Schritt erweitert werden, bei dem der unbeladene Transporter die Membran überquert (Niggli und Lederer, 1991a). Ein solcher zusätzlicher Schritt wird bei den diskutierten Transportmodellen aber nicht angenommen.

Milanick und Frame (1991) haben ein weiteres mögliches Reaktionsschema vorgeschlagen, das möglicherweise einige der Kontroversen zwischen dem simultanen und konseku-

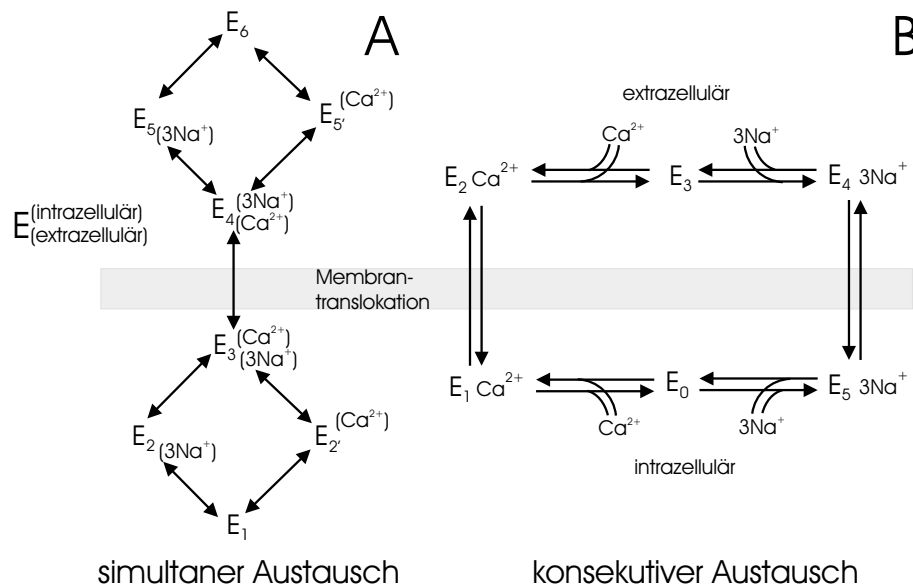


Abbildung 1.2: Reaktionsschemata der möglichen Transportmechanismen

A simultaner Austausch: ein Ion bindet von der *cis*-Seite der Membran, das Gegenion von der *trans*-Seite an den Austauscher. Die Translokation erfolgt dann gleichzeitig.

B konsekutiver Austausch: ein Ion bindet, wird über die Membran transloziert und dort abgegeben. Das Gegenion kann nun binden und wird nun seinerseits über die Membran transloziert. Der Austauscher kehrt damit in den Ausgangszustand zurück.

tiven Austausch lösen könnte: Danach erfolgt die Translokation zwar konsekutiv, aber zur Dissoziation des  $\text{Ca}^{2+}$ -Ions auf der Gegenseite muss zunächst mindestens ein  $\text{Na}^+$ -Ion binden. In diesem Reaktionsschema gibt es also mindestens einen Zustand, in dem das Protein sowohl  $\text{Ca}^{2+}$  als auch  $\text{Na}^+$  gleichzeitig gebunden hat. Unklar bleibt hier aber die Interpretation der Homoaustauschmodi des Austauschers, die für ein konsekutives Reaktionsschema sprechen.

### Transportraten und Elektrogenizität

Im  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschmodus wird eine Nettoladung über die Membran verschoben. Der Transport ist damit elektrogen und kann als elektrischer Strom mit elektrophysiologischen Methoden gemessen werden. Das Transportprotein selbst trägt wahrscheinlich ca. 2.5 negative Ladungen (Niggli und Lederer, 1991a, Niggli und Lederer, 1991b), so dass bei einem konsekutiven Transportmodell bei der  $\text{Ca}^{2+}$ -Translokation 0.5 negative Ladungen und bei der  $\text{Na}^+$ -Translokation 0.5 positive Ladungen in entgegengesetzter Richtung über die Membran verschoben werden.

Der Anteil der einzelnen Transportschritte an der Ladungsverschiebung ist unklar. Der  $\text{Na}^+$ -Translokationszweig muss einen Teil der Elektrogenizität ausmachen (Niggli und Lederer, 1991, Hilgemann et al., 1991). Da Kappl und Hartung (1996b) auch unter  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschbedingungen vorstationäre Ströme messen konnten, muss der  $\text{Ca}^{2+}$ -Translokationszweig ebenfalls elektrogene Schritte enthalten. Hierfür sprechen auch Spannungssprungexperimente an isolierten Membranflecken unter  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch-

bedingungen (Hilgemann, 1996, He et al., 1998).

Insgesamt zeigt der  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher nur eine geringe Spannungsabhängigkeit (Matsuoka und Hilgemann, 1992). Dies kann ein Hinweis auf das Vorhandensein nicht-elektrogener, aber ratenlimitierender Schritte sein.

Die maximale Transportrate des Austauschers wird kontrovers diskutiert. Sie reicht von  $100 \text{ s}^{-1}$  (Powell et al., 1993) bis einige  $1000 \text{ s}^{-1}$  (Hilgemann et al., 1991, Niggli und Lederer, 1991, Hilgemann, 1996, Baazov et al., 1999). Die  $\text{Na}^+$ -Bindung bzw. -Translokation wird als ratenlimitierend angesehen (Niggli und Lederer, 1991a), während einzelne Schritte der  $\text{Ca}^{2+}$ -Translokation sehr schnell ablaufen müssen, um das vorstationäre Stromsignal nach einem photolytischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung erklären zu können (Kappl und Hartung, 1996b).

## Selektivität

Der  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher hat eine relativ hohe Selektivität für  $\text{Na}^+$ , während die Selektivität für  $\text{Ca}^{2+}$  weniger stark ausgeprägt ist. Einwertige Ionen wie  $\text{Li}^+$ ,  $\text{K}^+$  oder  $\text{Cs}^+$  werden vom Wildtyp- $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher nicht transportiert (Reuter und Seitz, 1968). Ein  $\text{Li}^+$ -Transport konnte dagegen in einer Mutante des NCX1 beobachtet werden (Iwamoto et al., 1999b). Neben  $\text{Ca}^{2+}$  werden dagegen auch  $\text{Ba}^{2+}$  und  $\text{Sr}^{2+}$  transportiert (Blaustein und Santiago, 1977, Trospen und Philipson, 1983, Kimura et al., 1987, Trac et al., 1997, Condrescu et al., 1997). Neuere Untersuchungen zeigten zudem einen Transport von  $\text{Ni}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  (Egger et al., 1999, Tashiro et al., 2000).

## Regulation

Der  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher transportiert nicht nur  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Na}^+$ , sondern wird von diesen auch intrazellulär reguliert. In der Gegenwart von zytoplasmatischen  $\text{Na}^+$  zeigt der Austauscher eine deutliche Inaktivierung des Transportstroms (Hilgemann et al., 1992). Diese  $\text{Na}^+$ -abhängige Inaktivierung kann durch zytoplasmatisches  $\text{Ca}^{2+}$  aufgehoben werden. Hilgemann et al. haben eine Halbaktivierungskonzentration von  $1 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  gefunden, während Miura und Kimura (1989) einen  $K_D$ -Wert für die Aktivierung durch  $\text{Ca}^{2+}$  von  $22 \text{ nM}$  gemessen haben. Die Unterschiede erklären sich durch die deutliche pH-Abhängigkeit der  $\text{Na}^+$ -abhängigen Inaktivierung (Hilgemann et al., 1992): Bei einer Erhöhung des pH-Wertes von pH 6.8 auf pH 7.8 änderte sich der  $K_D$ -Wert für zytoplasmatisches  $\text{Ca}^{2+}$  (regulatorische Bindungsstelle) zur Aufhebung der  $\text{Na}^+$ -abhängigen Inaktivierung von  $\sim 10 \mu\text{M}$  auf  $< 0.3 \mu\text{M}$ . Die regulatorische  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstelle zeigt damit eine deutliche höhere Affinität als die Transportbindungsstelle. Ohne intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  und damit unbesetzter regulatorischer  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstelle ist der Austauscher inaktiv (DiPolo, 1979): Die Regulation durch  $\text{Ca}^{2+}$  ist also allosterisch (Weber et al., 2001). Durch intrazelluläre Applizierung von Chymotrypsin wird der Austauscher dereguliert, indem die  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Regulation aufgehoben wird (siehe hierzu Abschnitt 1.3.4).

$\text{Na}^+$ -Ionen sind ein Cofaktor für die Inhibierung des Austauschers durch intrazelluläre Protonen, indem sie wahrscheinlich die Protonen-Affinität erhöhen (Doering und Lederer, 1994, Doering et al., 1996). Vermutlich gibt es mehrere Protonenbindungsstellen am

Austauscherprotein, da auch der extrazelluläre pH-Wert den Austauscher beeinflusst. Egger und Niggli (2000) haben für die extrazelluläre pH-Abhängigkeit eine glockenförmige Kurve mit maximaler Austauscheraktivität bei pH 7.4 gefunden. Der genaue Mechanismus der pH-Regulierung und der damit verbundenen Beeinflussung der Elektrogenizität des Austauschers ist noch nicht verstanden. Die starke pH-Abhängigkeit dürfte aber eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie des Herzens spielen (Egger und Niggli, 2000).

Zytoplasmatisches ATP wirkt stimulierend auf den  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (DiPolo, 1974), indem die Affinität der regulatorischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstelle erhöht und die Inaktivierung durch  $\text{Na}^+$  reduziert wird (DiPolo und Beaugé, 1991, Hilgemann et al., 1992, Collins et al., 1992). Da Protein-Kinase-Inhibitoren und die Verwendung von  $\text{MgATP-}\gamma\text{-S}$  die Stimulierung nicht beeinflussten, erfolgt wahrscheinlich keine direkte Phosphorylierung des Austauschers (Collins et al., 1992). Stattdessen wird durch ATP die Bildung von Phosphatidyl-4,5-bisphosphat ( $\text{PIP}_2$ ) aus Phosphatidylinositol durch Phosphorylierung erhöht.  $\text{PIP}_2$  wiederum kann die  $\text{Na}^+$ -abhängige Inaktivierung aufheben, indem es mit der XIP-Region (s.u.) des Austauscher-Proteins wechselwirkt (Hilgemann und Ball, 1996, He et al., 2000).

Ungeklärt ist noch der Mechanismus, bei dem nichttransportierte Kationen wie  $\text{Li}^+$  oder  $\text{K}^+$  den Austauscher von der *trans*-Membranseite aus stimulieren und die Spannungsabhängigkeit beeinflussen können (Blaustein und Santiago, 1977, Gadsby et al., 1991, Khananshvili et al., 1991, Blaustein und Lederer, 1999).

## Inhibitoren

Es existieren zahlreiche Inhibitoren für den  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher, die allerdings größtenteils nicht sehr spezifisch sind. Das Fehlen eines spezifischen Inhibitors ist oftmals ein großer Nachteil bei elektrophysiologischen Messungen.

Zu den bekannten Inhibitoren zählen zum einen Amilorid-Derivate wie z.B. Benзамил und 3,4-Dichlorobenzamil, die mit einem  $K_i$  von 100  $\mu\text{M}$  bzw. 12  $\mu\text{M}$  (intrazellulär) 10 bzw. 100mal potenter den Austauscher hemmen als Amilorid selbst (Kleyman und Cragoe, 1988, Slaughter et al., 1988, Kaczorowski et al., 1989). Amilorid und seine Derivate hemmen allerdings z.B. auch den  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher oder spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, dies sogar zum Teil deutlich potenter als den  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (Blaustein und Lederer, 1999).

Zum anderen wird der Austauscher durch antiarrhythmische Substanzen wie Quinacrine oder Bepridil gehemmt (Garcia et al., 1988, Blaustein und Lederer, 1999). Der Block durch Bepridil ist nicht-kompetitiv zu  $\text{Ca}^{2+}$ , aber kompetitiv zu  $\text{Na}^+$  mit einem  $K_i$  von 30  $\mu\text{M}$ . Bepridil hemmt auch den  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschmodus.

Ein relativ neuer Inhibitor ist KB-R7943, ein Isothiourea-Derivat (Iwamoto et al., 1996, Iwamoto und Shigekawa, 1998, Ladilov et al., 1999). KB-R7943 hemmt den reversen Transportmodus ( $K_i=1.2\text{--}2.4\text{ }\mu\text{M}$  bei  $\text{Ca}^{2+}$ -Einwärtstransport) deutlich stärker als den normalen Transportmodus des Austauschers ( $K_i > 30\text{ }\mu\text{M}$ ). Der Block durch KB-R7943 ist nicht-kompetitiv zu  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Na}^+$ .

Desweiteren wird der  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher durch einige zyklische Peptide (Khananshvili et al., 1995) und durch Antisense-Oligodeoxynucleotide (Lipp et al., 1995) gehemmt.

Das bekannteste inhibitorische Peptid ist das *Exchanger Inhibitory Peptide*: XIP (Li et al., 1991, Matsuoka et al., 1997).

Wichtige Inhibitoren sind zudem inorganische Kationen. Insbesondere mehrwertige Kationen wie  $\text{La}^{3+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  oder  $\text{Mn}^{2+}$  sind potente Blocker ( $K_i=20\text{--}200\ \mu\text{M}$ ) für den  $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ -Austauscher, die allerdings auch andere  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportproteine hemmen (Trosper und Philipson, 1983, Kimura et al., 1987, Smith et al., 1987, Iwamoto und Shigekawa, 1998).  $\text{Mg}^{2+}$  ist dagegen nur ein schlechter Inhibitor des  $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ -Austauschers ( $K_i=12.5\ \text{mM}$ , Kimura, 1996). Der Block durch mehrwertige Kationen erfolgt dabei kompetitiv zu  $\text{Ca}^{2+}$ . Zum Teil wird auch von einem Transport der inhibitorischen mehrwertigen Kationen durch den Austauscher berichtet (siehe oben).

### 1.3.4 Struktur des $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ -Austauschers NCX1

Die cDNA, die den  $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ -Austauscher aus dem Herzen kodiert, hat eine Basenpaarlänge von 2910 Nukleotiden. Das Protein bestünde demnach aus 970 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 108 kDa (Nicoll et al., 1990). Allerdings wird eine Signalsequenz von 32 Aminosäuren am aminoterminalen Ende während der Translokation abgespalten, so dass das reife Protein ein Molekulargewicht von 105 kDa besitzt (Durkin et al., 1991). Diese Signalsequenz soll die korrekte Orientierung des Proteins in der Membran während der Proteintranslokation sicherstellen (Durkin et al., 1991).

In Abbildung 1.3 ist die gegenwärtig diskutierte Membrantopologie des  $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ -Austauschers dargestellt, die sich aus Hydropathizitätsprofilen und Cystein-Suszeptibilitäts-Analysen ergeben hat (Iwamoto et al., 1999a, Iwamoto et al., 2000, Qiu et al., 2001). Im Gegensatz zu früheren Topologiemodellen (Nicoll et al., 1990, Nicoll und Philipson, 1991, Philipson et al., 1996, Nicoll et al., 1996) werden statt 11 nur noch 9 Transmembransegmente postuliert. Das aminoterminal Ende des Proteins mit einer Glykosylierungsstelle (Hryshko et al., 1993) befindet sich auf der extrazellulären Membranseite, das carboxyterminale Ende auf der intrazellulären Membranseite.

Die intrazelluläre Schleife, die Segment eins und zwei verbindet, ist vermutlich an der Regulation des Austauschers durch  $\text{Na}^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$  beteiligt, da durch eine Mutation des Asparagin 101 zum Cystein die Regulation aufgehoben wird (Doering et al., 1998). Das cytoplasmatische Ende des Transmembransegments zwei ist zudem wahrscheinlich an der  $\text{Na}^+$ -Translokation beteiligt: Eine Mutation des Threonin 103 nahe der intrazellulären Schleife zwischen Segment eins und zwei zum Valin oder Cystein erhöht die Affinität des Austauschers für  $\text{Na}^+$ . Außerdem führt diese Mutation zu einem  $\text{Li}^+$ -Transport (Doering et al., 1998).

Zwischen Transmembransegment zwei und drei befindet sich eine extrazellulär zugängige, in die Membran ragende Schleife (sogenannte *pore-loop*-Struktur). Das Asn-125, das sich innerhalb dieser Schleife befindet, ist von der intrazellulären Seite zugänglich (Iwamoto et al., 1999). Diese *pore-loop*-Struktur spielt möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Substrat-Bindung und -Translokation. Bei Untersuchungen an Chimären zwischen NCX-1 und NCX-3 und Mutationen der Aminosäuren Asn-125 und Thr-127 haben Iwamoto et al. (1999a, 1999b) festgestellt, dass diese Region für die 10fach höhere  $\text{Ni}^{2+}$ -Affinität des NCX-1 im Vergleich zum NCX-3 verantwortlich ist. Iwamoto et al. (2000) haben deswei-





bransegmente eins und zwei wechselwirkt (Doering et al., 1998).

Ebenfalls auf der intrazellulären Schleife zwischen Transmembransegment fünf und sechs befindet sich eine alternative Spleißstelle, die zu unterschiedlichen Aminosäuresequenzen der verschiedenen  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher-Isoformen führen kann (Iwata et al., 1996, Schulze et al., 1996).

Zwischen Transmembransegment sieben und acht befindet sich eine intrazellulär zugängige *pore-loop*-Struktur, die zusammen mit dem intrazellulären Teil des Transmembransegments sieben den sogenannten  $\alpha_2$ -repeat, ein wiederum hochkonservierter Sequenzabschnitt, bildet. Im Gegensatz zu früheren Topologiemodellen befinden sich demnach die  $\alpha$ -repeats 1 und 2 auf entgegengesetzten Membranseiten. Das Val-820 und Gln-826 sind vermutlich an der Wechselwirkung des Austauschers mit  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Ni}^{2+}$  bzw.  $\text{Ni}^{2+}$  und  $\text{Li}^+$  beteiligt, wie Studien mit Mutanten gezeigt haben (Iwamoto et al., 1999b). Mutationen des Asp-829 und Asp-825 auf der *pore-loop*-Struktur führen außerdem zu einer höheren  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität, so dass diese *pore-loop* zwischen Transmembransegment sieben und acht und die *pore-loop* zwischen Transmembransegment zwei und drei vermutlich interagieren und an der Bildung eines Ionentransportweges beteiligt sind (Iwamoto et al., 1999a, Iwamoto et al., 1999b, Iwamoto et al., 2000). Qiu et al. (2001) schlagen daher auch eine dreidimensionale Anordnung der Transmembransegmente vor, in der sich die beiden *pore-loops* direkt gegenüber liegen (siehe Abbildung 1.4).

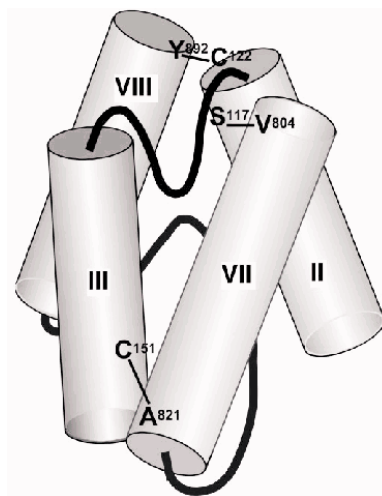


Abbildung 1.4: Dreidimensionale Anordnung der Transmembransegmente des  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers

Die *pore-loops* zwischen Transmembransegment sieben und acht und zwischen Transmembransegment zwei und drei liegen direkt gegenüber.

(Entnommen aus Qiu et al., 2001.)

## 1.4 Das *Xenopus*-Expressionssystem

Der afrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis* gehört zur Ordnung Anura (Froschlurche), Unterordnung Aglossa, Familie Pipidae. Obwohl er im deutschen Sprachgebrauch als Frosch, im englischen dagegen als Kröte („toad“) bezeichnet wird, grenzt er sich zoologisch von diesen ab. Namensgebendes Merkmal sind die Krallen an den Zehen der hinteren Extremitäten. Die natürliche Heimat ist Südafrika, wo der Krallenfrosch in stehenden Gewässern lebt. Da er sehr anspruchslos in Pflege und Haltung ist und leicht nachgezüchtet werden kann, wird *Xenopus laevis* seit Jahrzehnten als Labortier gehalten. Nachdem er zunächst als Schwangerschaftstestsystem fungierte (subkutane Injektion

von Urin führt zu spontanem Abblachen bei Vorhandensein des Schwangerschaftshormons Gonadotropin), ist er heute besonders in der Molekularbiologie beliebt: Die Oozyten des Krallenfrosches haben sich als leicht zu handhabendes Expressionssystem bewährt. Die heterologe Expression von Fremdproteinen in den Oozyten des Krallenfrosches wurde erstmals 1971 beschrieben (Gurdon et al., 1971). 1981 konnte dann gezeigt werden, dass Fremdproteine auch in der äußeren Plasmamembran der Oocyte exprimiert werden (Sumikawa et al., 1981).

Bis heute konnten neben zahlreichen eukaryotischen ebenso archaebakterielle (Bakteriorhodopsin) (Nagel et al., 1995) und pflanzliche Membranproteine (Boorer et al., 1992, Miller und Zhou, 2000) funktionell exprimiert werden. Desweiteren wurde das *Xenopus*-Expressionssystem erfolgreich zur sogenannten Expressionsklonierung („expression cloning“) eingesetzt (Hediger et al., 1987, Romero et al., 1998).

### 1.4.1 Morphologie der *Xenopus*-Oocyte

Das reife Ovar des Krallenfrosches enthält rund 30.000 Oozyten. Die Oozyten weisen einen unterschiedlichen Reifegrad auf und werden in sechs verschiedene Stadien eingeteilt: ausgehend vom Stadium I ( $\varnothing$  50-300  $\mu$ m, durchsichtig, Zellkern sichtbar, ohne umgebende Vitellinhülle) bis zum Stadium VI ( $\varnothing$  1.2–1.3 mm, dunkel pigmentierter „Animalpol“, gelblicher „Vegetalpol“, beide getrennt durch einen hellen Äquatorstreifen, umgebende Vitellinhülle). Neben der auffälligen Differenzierung in Animal- und Vegetalpol durch die Pigmentierung zeigt auch der Rest der Oocyte eine starke Polarisierung: Dotterpartikel, endogene mRNA, Rezeptoren und Kanäle sowie das Cytoskelett sind asymmetrisch in der Oocyte verteilt (Soreq und Seidman, 1992). Es wird z.B. eine 10mal höhere Expression der endogenen  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanäle im Animalpol im Vergleich zum Vegetalpol berichtet (Gomez-Hernandez et al., 1997).

### 1.4.2 Eigenschaften als Expressionssystem

Zur heterologen Expression muss entweder RNA oder DNA in die Zelle eingebracht werden. Die DNA muss in den Zellkern injiziert werden, weshalb die RNA-Injektion in das Cytoplasma oft bevorzugt wird. Die RNA sollte am 3'-Ende polyadenyliert sein, am 5'-Ende eine sogenannte „Cap“-Struktur (7-Methylguanosin-Reste) aufweisen und an beiden Enden nicht translatierte Regionen (meist vom *Xenopus*  $\beta$ -Globin-Gen) enthalten, da dies die Stabilität und das Expressionsniveau erhöht (Goldin und Sumikawa, 1992, Swanson und Folander, 1992). Die Translation der endogenen RNA wird durch die injizierte RNA kompetitiv gehemmt. Das Expressionsniveau wird daher im wesentlichen durch die Translationskapazität der Oocyte beschränkt (Taylor et al., 1985). Allerdings gibt es auch Berichte von einer Stimulierung endogener Membranproteine durch heterolog exprimierte Proteine (Attali et al., 1993, Tzounopoulos et al., 1995). Eine mögliche Wechselwirkung des heterolog exprimierten Membranproteins mit endogenen Proteinen sollte daher in Betracht gezogen werden.

Gegenüber bakteriellen Expressionssystemen bietet das Oocyte-System den Vorteil der posttranslationalen Modifikation des heterolog-exprimierten Proteins: Als eukaryo-

tische Zelle findet in der Oozyte z.B. eine Glykolisierung und Phosphorylierung des Proteins statt (Gurdon und Wickens, 1983, Colman, 1984). Die Translation der RNA beginnt sofort nach Injektion und erreicht in der Regel nach zwei bis drei Tagen den Höhepunkt. Zur Injektion werden meist Oozyten der Reifestadien V und VI genommen. Eine heterologe Expression von Fremdproteinen ist aber auch bei Verwendung der früheren Reifestadien II bis III möglich (Krafte und Lester, 1992).

### 1.4.3 Passive elektrische Eigenschaften der Oozytenmembran

Die passiven elektrischen Eigenschaften sowie die geringen Leitfähigkeiten durch endogene Transportproteine haben die *Xenopus*-Oozyte zu einem beliebten elektrophysiologischen Untersuchungssystem werden lassen.

Die Oozyte im Stadium V, die in der Regel für elektrophysiologische Messungen bevorzugt wird, hat eine typische Membrankapazität von ca. 230 nF. Durch die starke Einfaltung der Membranoberfläche (Bildung von Mikrovilli) ist diese Kapazität etwa fünfmal größer als von der Oberfläche einer Kugel gleichen Durchmessers und einer spezifischen Membrankapazität für Lipiddoppelschichten ( $d=5$  nm) von  $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  zu erwarten wäre. Bei Ganzzellmessungen, die eine hohe Zeitauflösung erfordern, werden daher z.T. Oozyten im Reifestadium II und III bevorzugt, die eine deutlich kleinere Membrankapazität aufweisen.

Das Ruhepotential der intakten Oozyte liegt um -50 mV (mit z.T. starken Variationen), bei dem die endogenen Ionenkanäle weitestgehend inaktiv sind. Der elektrische Widerstand liegt bei 1 bis 3 M $\Omega$ .

### 1.4.4 Endogene Transportproteine in der Oozytenmembran

Die Oozytenmembran weist verschiedene endogene Transportproteine auf, die z.T. in einer nur sehr geringen Expressionsdichte vorliegen und damit elektrophysiologische Messungen an heterolog exprimierten Proteinen nicht stören. Das Expressionsniveau der endogenen Transportproteine kann auch stark zwischen den verwendeten Oozytenchargen schwanken.

Die wichtigsten endogenen Ionenkanäle sind (Weber, 1999): ein durch Hyperpolarisation aktivierter Chloridkanal, ein Volumen-sensitiver Chloridkanal, verschiedene Kaliumkanäle, ein durch intrazelluläres Calcium aktivierter Chloridkanal (Barish, 1983), ein durch Depolarisation aktivierter Natriumkanal (Baud et al., 1982, Rettinger, 1999), spannungsabhängige Calcium-Kanäle (Dascal et al., 1992), ein mechano-sensitiver Kationenkanal (Methfessel et al., 1986) sowie ein durch extrazelluläres Calcium inaktivierter Chloridkanal (Reifarh et al., 1997).

Neben den Ionenkanälen enthält die Oozytenmembran auch zahlreiche primär- und sekundär-aktive Transportsysteme. Zu den elektrogenen Pumpen und Transportern gehören z.B. die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase und der  $\text{Na}^+/\text{Glukose}$ -Kotransporter. Die Existenz eines endogenen  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers wird ebenfalls berichtet (Schlif und Heinemann, 1995), konnte aber bei eigenen Messungen nicht bestätigt werden (siehe hierzu auch Kapitel 4).

## 1.5 Die Patch-Clamp-Technik

Die Patch-Clamp-Technik ist die heute wohl weltweit meistverwendete Messmethode in der Elektrophysiologie. Mit ihrer Hilfe war es erstmals möglich, mittels einer Glaselektrode Ströme einzelner Kanäle mit einer Auflösung von weniger 1 pA in biologischen Membranen zu registrieren. Die grundlegenden Entwicklungen dieser Messtechnik wurden von Erwin Neher und Bert Sakmann gemacht (Neher und Sakmann, 1976, Neher et al., 1978). 1980 gelang die entscheidende Verbesserung dieser neuen Messmethode, die den Namen „extracellular patch clamp“ bekommen hatte (Sigworth und Neher, 1980). Neher und Sakmann wurden für die grundlegenden Entwicklungen 1991 mit dem Nobelpreis für Physiologie und Medizin ausgezeichnet.

### 1.5.1 Grundlagen der Patch-Clamp-Technik

Grundlage der Patch-Clamp-Technik ist die Ausbildung eines sehr hohen Abdichtwiderstandes („Gigaohmseal“) zwischen der Oberfläche einer Glaspipette und der Zellmembran. Der hohe Abdichtwiderstand führt zu einem sehr guten Signal-Rausch-Verhältnis. Zudem kann das mit Pipette isolierte Membranstück alleine mittels der Patchpipettenelektrode auf ein Haltepotential geklemmt werden, ohne gesonderte Potentialelektroden hierfür einsetzen zu müssen, wie es bei herkömmlichen Ganzzelleableitungen nötig ist.

Der genaue Mechanismus, der zur Ausbildung eines Abdichtwiderstandes von bis zu 100 Gigaohm zwischen Zellmembran und Glaspipette führt, ist nicht bekannt. Allerdings zeigen Berechnungen, dass bei einem Widerstand größer 10 G $\Omega$  der Abstand zwischen Glaswand und Membran in der Größenordnung von 1 Å liegen muss (Hamill et al., 1981). Dieser Abstand liegt damit im Bereich der chemischen Bindung. Es kommen daher Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrückenbildung, Salzbrücken durch divalente Kationen oder Van-der-Waals-Kräfte zwischen den negativ geladenen Oberflächen des Membranlipids und des Glases in Betracht (Corey und Stevens, 1983).

Die grundlegenden Patch-Konfigurationen wurden 1981 in einer vielbeachteten Arbeit von Hamill et al. zusammengestellt. Zum besseren Verständnis sind die verschiedenen Patch-Konfigurationen und ihre Etablierung in der Abbildung 1.5 aufgeführt: Dies sind „cell-attached“ (Abb. 1.5D), „whole-cell“ (Abb. 1.5F), „outside-out“ (Abb. 1.5H) und „inside-out“ (Abb. 1.5I). Die Namensgebung deutet auf die Zugänglichkeit der Membranoberfläche zur Badlösung hin. Durch die geeignete Wahl der Zusammensetzung der Pipettenlösung und der (im Experiment auswechselbaren) Badlösung lassen sich definierte Bedingungen auf beiden Seiten der Membran einstellen.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Messkonfiguration ist der „Inside-out“-Patch (Horn und Patlak, 1980, Hamill und Sakmann, 1981, Abb. 1.5I).

Da bei der Inside-out- und der Outside-out-Konfiguration der Membranflecken vom Rest der Zelle getrennt wird, werden sie auch als zellfreie Konfigurationen bezeichnet. Insbesondere bei der Inside-out-Konfiguration werden alle nicht in der Membran verankerten Zellbestandteile durch Lösungswechselexperimente ausgewaschen. Infolgedessen können während eines Experiments „Rundown“-Effekte auftreten: das Stromsignal nimmt stetig ab, da z.B. Phosphorylierungen nicht mehr möglich sind.

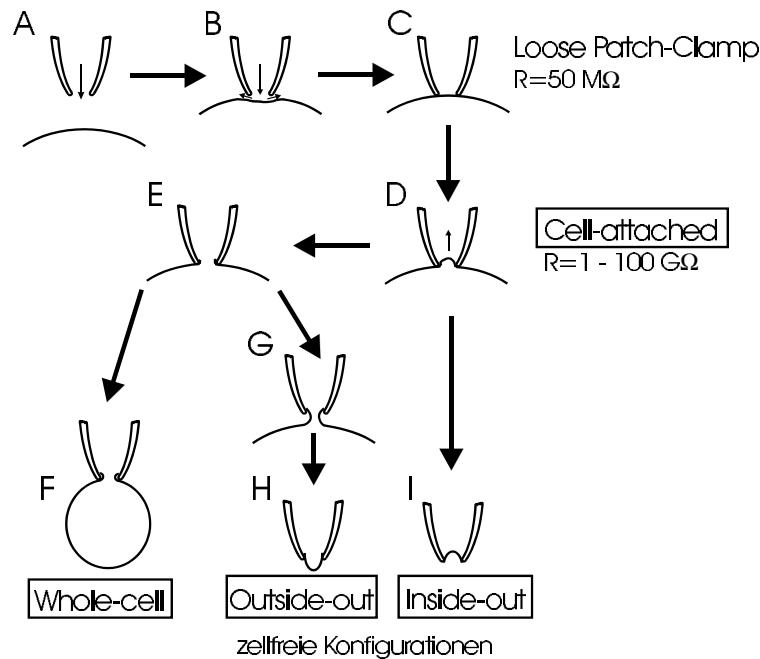


Abbildung 1.5: Die Patch-Clamp-Messkonfigurationen und ihre Etablierung

Dargestellt sind die vier wichtigen Messkonfigurationen der Patch-Clamp-Technik. Ein kleiner Pfeil innerhalb der Patchpipette deutet Unterdruck bzw. Überdruck an. Durch Zurückziehen der Patchpipette kann ein isolierter Membranfleck herausgerissen werden (I und H). Von D nach E (Durchbruch der Membran unter der Pipettenöffnung) gelangt man durch Anlegen eines kurzen Unterdruck- oder Spannungspulses. (Verändert nach Hamill et al., 1981)

### 1.5.2 Die Giant-Patch-Technik

Ein Ionenkanal läßt im geöffneten Zustand typischerweise  $10^7$  einwertige Ionen pro Sekunde passieren. Das Stromsignal eines Kanals liegt demnach im Bereich von ca. 1 pA, was in etwa der messtechnisch möglichen Auflösung entspricht. Transporter und Pumpen haben dagegen ca. 3 Größenordnungen kleinere Transportraten, so dass die zu erwartende Ströme eines einzelnen Proteins ebenfalls um 3 Größenordnungen kleiner sind. Die Isolierung des Stromsignals eines einzelnen Proteins ist damit mit der gegenwärtigen Messtechnik nicht möglich. Um auch von Transportern und Pumpen Ströme registrieren zu können, müssen diese daher in sehr hoher Zahl vorliegen, so dass die Summe der Einzelströme im Auflösungsvermögen der Messapparatur liegt. Da die Zahl der Proteine über die Expressionsdichte an die Membranfläche gekoppelt ist, muss diese entsprechend groß sein. Von den von Hamill et al. beschriebenen Patch-Konfigurationen erfüllt nur die Ganzzell-Konfiguration diese Voraussetzung zur Messung eines Transporter- bzw. Pumpenstroms.

Eine andere Möglichkeit ist die Verwendung großer Pipettendurchmesser, wie sie zuerst von Stühmer et al. eingesetzt wurden (Stühmer et al., 1983). Der entscheidende Schritt zur Ausbildung eines Gigaseals gelang aber erst Hilgemann im Jahre 1989 mit einer Weiterentwicklung der Inside-out-Konfiguration (Hilgemann, 1989): Unter Verwendung von Pipetten mit großem Öffnungsdurchmesser ( $\varnothing 10 - 16 \mu\text{m}$ ) konnte Hilgemann sehr große

Membranflecken („giant patch“) von Herzmuskelzellen in der Inside-out-Konfiguration isolieren. Diese Giant-Patch-Methode wurde erfolgreich auf *Xenopus*-Oozyten übertragen, mit Pipettenöffnungsdurchmesser von bis zu 50  $\mu\text{m}$ . Auch ein Giant-Patch in der Outside-out-Konfiguration konnte an Oozytenmembranen etabliert werden (Rettinger et al., 1994).

Zusammen mit der heterologen Überexpression des  $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ -Austauschers in Oozyten bietet die Giant-Patch-Technik die beste Voraussetzung für die kinetischen Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit, da in dieser Kombination ein sehr gutes Signal-Rausch-Verhältnis erreichbar ist.

### 1.5.3 Messung von vorstationären Strömen an Kanälen und Transportern

Kinetische Messungen an Transportproteinen sollen Informationen über den zu Grunde liegenden Reaktionsmechanismus liefern, indem man versucht, die Zahl der Reaktionsschritte und die zugehörigen Geschwindigkeitskonstanten aus dem gemessenen Stromsignal zu bestimmen. Daher ist es notwendig, den Ursprung des Stromsignals zu verstehen.

Das Stromsignal eines Kanals hängt von der Permeabilität  $P_S$  des Kanals für das Ion  $S$  und dem elektrochemischen Gradienten als treibende Kraft ab. Der Zusammenhang dieser Größen wird mit der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung beschrieben (Hille, 1992):

$$I_S = P_S z_S^2 \cdot \frac{EF^2}{RT} \cdot \frac{[S]_i - [S]_a \exp(-z_S FE/RT)}{1 - \exp(-z_S FE/RT)}$$

( $I_S$ : Strom durch das Ion  $S$ ,  $P_S$ : Permeabilität,  $z_S$ : Valenz,  $E$ : Membranpotential,  $[S]_{i,a}$ : innere/äußere Konzentration des Ions  $S$ ,  $F$ : Faradaykonstante,  $R$ : Boltzmannkonstante,  $T$ : absolute Temperatur)

Im Gegensatz zu einer Einzelkanalmessung, bei der tatsächlich das Öffnen und Schließen eines einzelnen Kanals beobachtet werden kann, wird bei Verwendung großer Giant-Patch-Pipetten das Stromsignal vieler Kanäle aufgezeichnet. Im Fall nicht wechselwirkender Kanäle ergibt sich das gemessene Stromsignal als Summe aller Einzelkanalströme. Bei  $N$  Kanälen mit gleicher Einzelkanalleitfähigkeit (und damit gleichem Einzelkanalstrom  $I_{\text{Einzel}}$ ) gilt also:

$$I_{\text{Vielkanal}} = N \cdot I_{\text{Einzel}} \cdot P_o$$

Eine Änderung des Stromsignals ist damit proportional zu einer Änderung der Öffnungswahrscheinlichkeit  $P_o$ , da nur geöffnete Kanäle zum Stromsignal beitragen und  $I_{\text{Einzel}}$  und  $N$  normalerweise konstant sind. Allerdings kann man aus dem so gemessenen stationären Stromsignal keine Information über die Kinetik erhalten. Im Vergleich zu einer Einzelkanalmessung, bei der man über die mittlere Offen- und Geschlossenzeit die Geschwindigkeitskonstanten für das Öffnen und Schließen direkt bestimmen kann, geht bei einer Vielkanalmessung daher kinetische Information verloren, sofern man nur einen stationären Zustand betrachtet.

Um dennoch kinetische Information aus Vielkanalmessungen gewinnen zu können, muss man deshalb Relaxationsmessungen durchführen. Dabei wird ein stationärer Zustand gestört (z.B. durch einen Spannungssprung oder einen Konzentrationsprung), um

eine Änderung der Offenwahrscheinlichkeit hervorzurufen. Dadurch ergibt sich dann ein neuer stationärer Zustand. Das Stromsignal des Übergangs zwischen diesen stationären Zuständen (vorstationärer Strom) enthält Informationen über alle dem Öffnen vor- und nachgelagerten Schritte.

Im Gegensatz zu Kanälen gibt es bei Transportern keinen diskreten Übergang zwischen offenen und geschlossenen Zuständen. Zum Stromsignal tragen daher alle Schritte des Reaktionsmechanismus bei, bei denen eine Ladung verschoben wird, während zur Kinetik auch nicht-elektrogene Schritte beitragen können. Die mit einer Ladungsverschiebung verbundenen Schritte werden als *elektrogen* bezeichnet. Für einen solchen Schritt vom Zustand  $E_i$  zum Zustand  $E_{i+1}$  gilt für die verschobene Ladung  $Q_i = e_0 \alpha_i z_i \nu_i$  und damit für das gemessene Stromsignal (Läuger, 1991):

$$I(t) = e_0 N \sum_i z_i \alpha_i \Phi_i(t) \quad \text{mit} \quad \Phi_i = \nu_i \left[ \frac{N_i(t)}{N} \cdot k_{i,\text{hin}}(c, V) - \frac{N_{i+1}(t)}{N} \cdot k_{i,\text{rück}}(c, V) \right]$$

( $e_0$ : Elementarladung,  $N$ : Gesamtanzahl an Transportern,  $N_i$ : Transporter im Zustand  $E_i$ ,  $\alpha_i$ : Dielektrizitätskoeffizient,  $\Phi_i$ : Flussrate des Schritts  $E_i \rightarrow E_{i+1}$ ,  $\nu_i$ : Anzahl der verschobenen Ladungen,  $z_i$ : Valenz,  $k_{\text{hin},\text{rück}}$ : Geschwindigkeitskonstanten für Hin-/Rückreaktion (konzentrations- und/oder spannungsabhängig),  $N = \sum_i N_i$ )

Eine Störung eines stationären Zustandes durch z.B. einen Konzentrations- oder Spannungssprung führt wie bei den Kanälen zu einer Änderung der konzentrations- bzw. spannungsabhängigen Geschwindigkeitskonstanten und damit zur Einstellung eines neuen Gleichgewichts. Der vorstationäre Strom enthält dann Informationen über die Reaktionsschritte.

Allgemein gilt, dass bei einem Reaktionsschema mit  $n$  Zuständen das vorstationäre Stromsignal mit maximal  $n - 1$  Exponentialfunktionen darzustellen ist. Die tatsächliche Anzahl an Exponentialfunktionen hängt allerdings von der Lage der elektrogenen Schritte (bzw. der Offen-Zustände) und der ratenlimitierenden Schritte ab, da Schritte im schnellen Vorgleichgewicht nicht getrennt werden können. Ebenso können Schritte mit gleichen Geschwindigkeitskonstanten nicht unterschieden werden. Weitere Information zur Lage der elektrogenen Schritte kann die Spannungsabhängigkeit des Stromsignals liefern.

Bei Konzentrationssprungexperimenten wird die Lösungszusammensetzung in der Regel so gewählt, dass das Transportprotein hauptsächlich in einem Zustand vorliegt, in dem es zur Substratbindung bereit ist. Dies erleichtert die spätere Interpretation der Signale, da man auf diese Weise bekannte Ausgangszustände des Transportproteins erreicht.

### 1.5.4 Photolyse von photolabilen Substraten

Ein Konzentrationssprung zur Messung eines vorstationären Stromsignals sollte möglichst schnell erfolgen, das heißt idealerweise eine rechteckige Konzentrationsstufe bilden. Dadurch wird vermieden, dass der Konzentrationsanstieg selbst ratenlimitierend wirkt und so das vorstationäre Signal beeinflusst. Mit einem sehr schnellen Konzentrationsanstieg kann dann sogar die Kinetik von Bindungsreaktionen gemessen werden. Im Patch-Clamp-Experiment reicht die Zeitauflösung eines Lösungswechselsystems hierfür in der Regel



nicht aus, da sich über der Membranoberfläche eine ungerührte Lösungsschicht befindet, die nur langsam durch Diffusion ausgetauscht wird. Bei der Inside-out-Patch-Konfiguration liegt der Membranfleck zudem in einer Omega-förmigen Einstülpung in der Pipettenöffnung vor, die einen schnellen Lösungsaustausch an der Membranoberfläche zusätzlich erschwert. Hierbei spielt die Pipettengeometrie ebenfalls eine wichtige Rolle (Cannell und Nichols, 1991).

Ein anderer Weg schnelle Konzentrationssprünge durchzuführen, besteht in der Verwendung von photolabil geschützten Substraten („caged compounds“): Durch Belichtung mit einer UV-Lichtquelle wird eine photolabile Schutzgruppe von einem Substrat abgespalten und so ein Konzentrationssprung erzeugt. Kaplan et al. zeigten 1978 als erste die Anwendbarkeit eines solchen Verfahrens auf biologische Systeme mit der Photolyse eines photolabilen ATP-Derivats zur Aktivierung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (Kaplan et al., 1978).

Mittlerweile sind zahlreiche photolabile Derivate von z.B. Neurotransmittern, Nukleotiden, Peptiden oder Chelatoren divalenter Kationen mit verschiedensten Schutzgruppen synthetisiert worden (McCray und Trentham, 1989, Adams und Tsien, 1993). Bei Verwendung eines kurzen UV-Laserpulses als Lichtquelle können Konzentrationssprünge mit einer Zeitauflösung bis z.T. in den Mikrosekundenbereich durchgeführt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde DM-Nitrophen, ein photolabil geschützter Calcium-Chelator, verwendet (siehe hierzu Kapitel 2.3.4).

Ein großer Nachteil der photolabilen Substanzen liegt in der Notwendigkeit, hohe Energiedichten einsetzen zu müssen, um eine entsprechende Freisetzung des Substrats zu erreichen. Die hohen Energiedichten können zu einer drastischen Verminderung des Abdichtwiderstands bei einer Patch-Clamp-Messung führen.

## 1.6 Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit soll die Kinetik zweier  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierter Transportproteine untersucht werden: Zum einen ist es der endogene  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte Chloridkanal in der Plasmamembran der *Xenopus* Oozyte. Zum anderen ist es der heterolog in Oozyten exprimierte  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher NCX1 aus dem Meerschweinchenherzen.

Bisherige Untersuchungen an den endogenen  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanälen der *Xenopus* Oozyte wurden hauptsächlich mit der Zweielektrodenspannungsklemme bzw. am *excised-membrane-patch* im Lösungswechselexperiment durchgeführt. Diesen Messtechniken mangelt es an der benötigten Zeitauflösung, um auch schnelle vorstationäre Kinetiken registrieren zu können. Zudem hat man bei der Zweielektrodenspannungsklemme keine Kontrolle über das intrazelluläre Milieu. Mit der Photolyse eines photolabilen  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelators am *excised*-Makropatch sollte diese Einschränkung in der vorliegenden Arbeit umgangen werden, um so neue Einblicke in die Kinetik der  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanäle zu erlangen.

Die Messungen an den Chloridkanälen waren als Vorbereitung für die Untersuchungen am heterolog in *Xenopus* Oozyten exprimierten  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher NCX1 zu verstehen. Messungen mit Hilfe der Photolyse von sogenanntem „Caged Calcium“ wurden bereits erfolgreich von M. Kappl (1997) am nativen NCX1 aus dem Meerschweinchenher-

zen durchgeführt. Diese Messungen hatten bereits die besondere Eignung des photolabilen „Caged Calcium“ für die Messung der schnellen vorstationären Kinetik des  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers gezeigt. Allerdings fehlte bisher eine vollständige Untersuchung der  $\text{Ca}^{2+}$ - und der Spannungsabhängigkeit dieser vorstationären Kinetik. Dies war unter anderem auf das begrenzte Signal-Rausch-Verhältnis der Messungen an nativen Herzzellmembranflecken zurückzuführen. Mit der heterologen Expression des  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers konnte die Signalamplitude und damit das Signal-Rausch-Verhältnis in der vorliegenden Arbeit dagegen deutlich gesteigert werden, so dass eine detaillierte Untersuchung der  $\text{Ca}^{2+}$ - und Spannungsabhängigkeit der vorstationären Kinetik durchgeführt werden konnte.

Zudem soll in dieser Arbeit auch der Einfluss von  $\text{Ba}^{2+}$  und  $\text{Sr}^{2+}$  als ebenfalls transportierte zweiwertige Kationen auf die vorstationären Ströme untersucht werden, um so weitere Einblicke in die Transportkinetik des  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers zu gewinnen.

# Kapitel 2

## Material und Methoden

### 2.1 Liste der verwendeten Geräte und Materialien

#### Geräte zur Patch-Clamp-Messung

Gerät	Hersteller/Anbieter
Axopatch 200A mit Headstage CV AU 201	Axon Instruments, Foster City, Kalifornien
Axopatch 200B mit Headstage CV 203 BU	Axon Instruments, Foster City, Kalifornien
AD/DA-Wandlerkarte Digidata 1200A	Axon Instruments, Foster City, Kalifornien
Kolter AD-Wandlerkarte AD12	MFK Frankfurt
Tiefpaßfilter Modell 3321	Krohn Hite, Avon, Massachusetts
Digitales Speicheroszilloskop HM208	Hameg, Frankfurt
Papierschreiber BD112	Kipp & Zonen, Delft, Niederlande
Elektroventile Typ LFAA1201718H	LEE Hydraulische Miniaturkomponenten, Frankfurt
Ventilsteuerung	Institutswerkstatt
Stromverstärker ITHACO1211	Ithaco Inc., Ithaco, New York
Netzgeräte Toe8721	Toellner, Herdecke
Faraday-Käfig	Institutswerkstatt
schwingungsgedämpfter Tisch Typ VW-3036	Newport Corporation, Irvine, Kalifornien
hydraulischer Mikromanipulator MO-103	Narishige Scientific Instruments, Tokyo, Japan
mechanischer Mikromanipulator	Laborbedarf Helmut Saur, Reutlingen
Thermometer und Thermofühler	Greisinger Elektronik, Regenstauf
thermostatisiertes Wasserbad	mgw Lauda, Lauda-Königshofen
R2911C FFT Servo Analyzer	Advantest Corp., Tokyo, Japan
Mikrolösungswechselverteiler	Institutswerkstatt
Meßkammer für Lösungswechsel	Eigenbau
Pipettenziehgerät DMZ Universal Puller für Patchpipetten	Zeitz-Instrumente Vertriebs GmbH, München
Vertikalpipettenziehgerät Model 700D für Injektionskapillaren	David Kopf Instruments, Tujunga, Kalifornien, USA
Mikroinjektionspumpe	Drummond Scientific Co., Broomall, Pennsylvania, USA

## Software zur Datenerfassung und -auswertung

Programm	Hersteller/Anbieter
pClamp 8.0 Programmpaket (Clampex 8.0 zur Datenerfassung, Clampfit 8.0 zur Datenanalyse)	Axon Instruments, Foster City, Kalifornien
KAN1	MFK, Frankfurt
Origin 6.0	Microcal Software Inc., Northampton, Massachusetts
Scientist 2.01	MicroMath Software, Salt Lake City, Utah
WinMaxc (Programm zur Berechnung von $\text{Ca}^{2+}$ -Chelatoren)	Chris Patten, Download unter: <a href="http://www.stanford.edu/cpatton/maxc.html">www.stanford.edu/cpatton/maxc.html</a>

## Optische Komponenten

Komponente	Hersteller/Anbieter
Binokulare	Wild, Heerbrugg, Schweiz
Mikroskop Axiovert 35M	Zeiss, Oberkochen
XeCl-Excimer-Laser LEXTRA 50	Lambda Physik, Göttingen
Lichtleiter UV/VIS Quarzfaser, Typ UV400/4248, Kerndurchmesser 400 $\mu\text{m}$	CeramOptec GmbH, Bonn
x-y-Faserpositionierung	Newport, Darmstadt
Neutralglasfilter für UV	Melles Griot, Zenenaar, Niederlande
Laserenergiemeßgerät DGX	Ophir Optronics, Jerusalem, Israel
UV/VIS Zylinderlinse für Farbstoffküvettenanregung	LinosPhotonics, Göttingen
UV/VIS Quarzlinse für Fasereinkoppelung	LinosPhotonics, Göttingen
Photodiode BPW21	Reichelt Elektronik, Sande
Quarzküvette (3.5 ml, 1cm Schichtdicke) für Farbstofflaser	LS Laborservice, Darmstadt

## Verbrauchsmaterialien

Komponente	Hersteller/Anbieter
Patch-Pipettenglas Clark GC150-7.5	Harvard Apparatus Ltd., Edenbrigde, Kent, UK
Injektionskapillaren #3-00-203-G/X	Drummond Scientific Co., Broomall, Pennsylvania, USA
Lotglas 8472 K3	Schott, Landshut
Silberdraht $\varnothing$ 0.25 mm für Elektroden,	Alfa Aesar Johnson Matthey GmbH, Karlsruhe
Platindraht $\varnothing$ 0.3 mm für Mikroschmiede	
Quarzkapillare TSP320450 für Lösungszufuhr und Mikrosalzbrücken, $\varnothing$ (ID/AD) 320/450 $\mu\text{m}$	Composite Metal Services LTD, Hallow, Worcs., UK
Sterilfilter 0.22 $\mu\text{m}$	LS Laborservice, Darmstadt
div. Silikon-, Teflon- und PE-Schläuche	LS Laborservice, Darmstadt Reichelt Chemietechnik GmbH, Heidelberg

## Chemikalien

Substanz	Hersteller/Anbieter
Laserfarbstoff BiBuQ	Lambda Physik, Göttingen
DM-Nitrophen	Molecular Probes, Eugene, Oregon
Fluo-3 Pentaammoniumsalz Lot 2871-2	Molecular Probes, Eugene, Oregon
$\alpha$ -Chymotrypsin Typ I-S	Sigma, Deisenhofen
3-Aminobenzoessäureethylester-Methansulfonat (Tricain)	Sigma, Deisenhofen
Collagenase Worthington, Typ 2 CLS 2	Boehringer Mannheim, Mannheim
Vitamin-E-Acetat	Fluka, Deisenhofen
Niflumic Acid	Sigma, Deisenhofen
Flufenamic Acid	Sigma, Deisenhofen
NaCl p.a.	Merck, Darmstadt
NaOH p.a.	Merck, Darmstadt
LiOH Monohydrat SigmaUltra	Sigma, Deisenhofen
CsOH Monohydrat Assay 95%	Fluka Deisenhofen
2-N-Morpholinoethansulfonsäure (MES) >99.5%	Sigma, Deisenhofen
HEPES >99.5% SigmaUltra	Sigma, Deisenhofen
TEA-Cl $\geq 99\%$ MicroSelect	Fluka, Deisenhofen
EDTA $\sim 99\%$ SigmaGrade	Sigma, Deisenhofen
EGTA $\geq 99\%$ MicroSelect	Fluka, Deisenhofen
Strontium-Acetat	Aldrich, Deisenhofen
TEA-OH 20% wässrige Lösung	Sigma, Deisenhofen
KCl p.a.	Merck, Darmstadt
$\text{CaCl}_2$ p.a.	Merck, Darmstadt
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ p.a.	Merck, Darmstadt
L-Aspartic acid >99% SigmaUltra	Sigma, Deisenhofen
Calcium Cyclamat p.a.	Sigma, Deisenhofen
Ba-Acetat p.a.	Sigma, Deisenhofen
N-Methyl-D-Glucamin (NMG) >99%	Fluka, Deisenhofen
Ca-Gluconat p.a.	Merck, Darmstadt
HCl 1N	Merck, Darmstadt
Agarose	Serva, Heidelberg
Dioxan	Merck, Darmstadt

## 2.2 Heterologe Expression des $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ -Austauschers in *Xenopus* Oozyten

In der Plasmamembran von Herzzellen wird der  $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ -Austauscher in besonders hoher Dichte exprimiert (Kofuji et al., 1992). Frühere Messungen am  $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ -Austauscher NCX1 wurden daher in unserem Labor an isolierten Herzzellen vom Meerschweinchen durchgeführt (Kappl und Hartung, 1996a, b). Da der  $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ -Austauscher NCX1 aus dem Hunde- und Meerschweinchenherzen bereits erfolgreich kloniert und in Oozyten exprimiert wurde (Nicoll et al., 1990, Tsuruya et al., 1994), lag es nahe, den  $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ -Aus-

tauscher aus dem Meerschweinchenherzen zu klonieren, um so die Vorteile des Oozyten-expressionssystems nutzen und gleichzeitig das untersuchte Membranprotein beibehalten zu können.

Sowohl die Herstellung der cDNA und mRNA zur Injektion in *Xenopus* Oozyten als auch die Oozytenpräparation wurden nicht selbst durchgeführt. Die Vorgehensweise soll aber der Vollständigkeit halber kurz beschrieben werden.

### 2.2.1 Klonierung des $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ -Austauschers aus dem Meerschweinchenherzen

Der  $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ -Austauscher NCX1 aus dem Meerschweinchenherzen wurde in unserem Institut von Frau Verena Pintschovius unter der Leitung von Dr. Phil Wood kloniert.

Ein Meerschweinchen wurde mit Chloroform betäubt und anschließend per Durchtrennung der Halsschlagader getötet. Aus dem toten Tier wurde der Herzmuskel freipräpariert und dann mit einem Polytron PT 1200C Handhomogenisator (Kinematica AG, Schweiz) homogenisiert. Die gesamte RNA wurde danach mit dem „Qiagen RNeasy Mini Kit“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) extrahiert. Es wurden komplementäre DNA-Primer zum Meerschweinchen-NCX1-Leseraster synthetisiert (MWG Biotech GmbH, Ebersberg, Deutschland), um dann mittels RT-PCR (Titan one-tube RT-PCR Kit, Roche, Mannheim) aus der nativen mRNA des  $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ -Austauschers doppelsträngige cDNA zu amplifizieren. Die cDNA wurde anschließend in den pCR-TOPO-II-Vektor kloniert (TOPO-TA-System, Invitrogen, Groningen, Niederlande).

Unter Verwendung von Standardmethoden wurden Klone gepickt, diese auf einem Agarosegel auf ihre Größe hin untersucht und anschließend vollständig sequenziert (ABI 310 Sequenzierer, Applied BioSystems, CA, USA).

Der Klon mit der richtigen DNA-Sequenz wurde dann in den pNKS4-Vektor (siehe Abb. 2.1) umklont. Die Linearisierung des pNKS4-Vektor erfolgte durch die Xba1-Re-

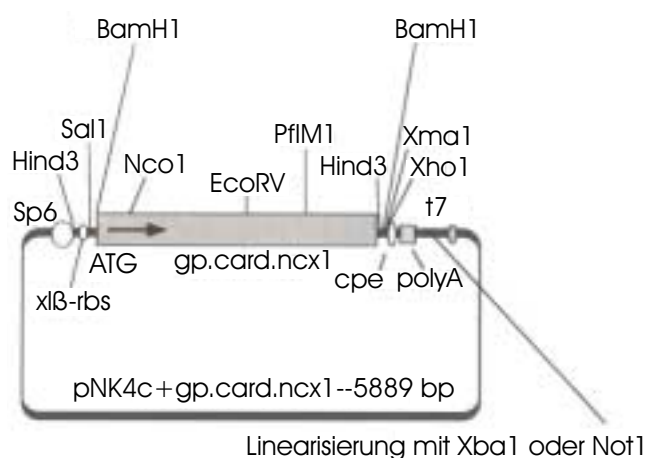


Abbildung 2.1: Der pNKS4-Vektor, in den das  $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ -Austauscher-Insert von 5889 Basenpaaren einkloniert wurde. Die Linearisierung zur mRNA-Herstellung erfolgte durch die Xba1-Restriktionsendonuklease.

striktionsendonuklease. Letztendlich wurde die mRNA zur Injektion in *Xenopus* Oozyten unter Verwendung des „Ambion mMessage mMachine kit“ (Ambion, Austin, Texas, USA)

hergestellt. Diese mRNA weist den für die Oozytenexpression typischen Poly-A-Schwanz am 3'-Ende und den SP6-Promotor am 5'-Ende auf.

### 2.2.2 Präparation der *Xenopus* Oozyten

#### Entnahme des Ovargewebes

Die Oozyten werden aus dem Ovargewebe eines geschlechtsreifen, weiblichen Frosches der Gattung *Xenopus laevis* gewonnen, das dem Frosch zuvor durch eine Laparotomie entnommen wird. Hierzu wird der Frosch für fünf bis zehn Minuten in 6°C kalter wässriger Tricainlösung (3-Aminobenzoessäureethylester, 0.2 %) gebadet, bis der Frosch keine Bewegung der Beinmuskulatur mehr zeigt. Anschließend wird der Frosch mit Wasser gespült und dann mit der Bauchseite nach oben in eine mit Eis gefüllte Wanne gelegt. Die Bauchhaut des Frosches samt dem darunter befindlichen Muskel wird danach in Höhe des Beinmuskellansatzes ca. ein Zentimeter weit eingeschnitten. Mit einer stumpfen Pinzette können durch diese Öffnung nun vorsichtig einzelne Ovarlappen herausgezogen und dann abgetrennt werden. Der Schnitt in der Bauchdecke einschließlich des durchtrennten Muskels wird mit zwei Stichen genäht. Anschließend wird der noch narkotisierte Frosch bis zum Aufwachen in feuchte Tücher gewickelt, um ein Ertrinken des Tieres bei direktem Zurücksetzen in das Wasserbecken zu verhindern. Nach dem Aufwachen wird der Frosch für drei Tage in ein gesondertes Quarantänebecken gesetzt, um so die Wundheilung besser kontrollieren zu können. Die Wunde selbst ist äußerlich meist innerhalb einer Woche gut verheilt. Nach drei Monaten Schonzeit kann der Frosch erneut operiert werden.

#### Isolierung der Oozyten

Das entnommene Ovargewebe wird mit Pinzetten mechanisch zerkleinert und dann das im Bindegewebe enthaltene Kollagen enzymatisch (30 mg/ml Kollagenase A in ORI (Oozyten-Ringer-Lösung, siehe Lösungen auf Seite 47) für drei bis fünf Stunden bei 18°C) verdaut. Anschließend wird der Verdau durch mehrmaliges Waschen mit ORI-Lösung abgebrochen, da eine zu lange Behandlung der Oozyten mit Kollagenase die Qualität der Oozyten beeinträchtigen kann. Durch das Waschen mit ORI-Lösung werden neben dem unerwünschten Bindegeweberesten auch kleine, unreife und durch den Kollagenaseverdau geschädigte Oozyten entfernt. Aus den so gereinigten Oozyten werden nun die zur RNA-Injektion gewünschten Oozyten im Stadium V (Durchmesser ca. 1.2 mm), die keine sichtbaren Schädigungen aufweisen und möglichst frei von Follikelgewebe sind, selektiert. Bis zur weiteren Verwendung werden die Oozyten bei 16 bis 18°C in ORI-Pen/Stryp-Lösung (ORI mit 9.5 mg/l Penicillin und 10 mg/l Streptomycin) inkubiert.

### 2.2.3 Injektion der mRNA in Oozyten

Die Injektion der mRNA in die Oozyten erfolgt mit einer Nanoliter-Injektionspumpe (Drummond Scientific Co.). Hierzu werden die Injektionskapillaren (Drummond Scientific Co.) auf einem Vertikalpuller (David Kopf Instruments) in einem Zug auf einen engen Öffnungsdurchmesser mit sehr flachen Flanken (sehr kleiner „Taper“) lang ausgezogen. Mit

einer feinen Schere werden die ausgezogenen Kapillarhälften unter einem Mikroskop auf einen Öffnungsdurchmesser von 16 bis 20  $\mu\text{m}$  mit möglichst spitzen Bruchstellen abgebrochen. Diese Injektionskapillaren werden nun von hinten mit rotgefärbtem schwerem Mineralöl (Sigma, Deisenhofen) luftblasenfrei befüllt und in die Injektionspumpe eingesetzt. Anschließend wird ein RNA-Tropfen (800 nl, 0.15  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  RNA in RNase-freiem DECP-Wasser) in die Kapillare aufgezogen. Die Oozyten werden dann mit 32 nl ( $\equiv 4.8$  ng) der RNA in Höhe des Überganges zwischen Animal- und Vegetalpol injiziert, ein Teil der Oozyten dabei auch mit der doppelten RNA-Menge (9.6 ng). Die ca. 20 injizierten Oozyten werden zu je drei in einzelne Petrischälchen, die mit ORI-Pen/Stryp gefüllt sind, gesetzt und in einem Kühlschrank bei 16–18 °C inkubiert. Ebenso wird mit nicht-injizierten Kontrollloozyten verfahren.

Die mit der RNA injizierten Oozyten können dann ab dem zweiten Tag der Expression zur Messung verwendet werden (abhängig von der injizierten RNA-Menge). Die Expression des  $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ -Austauschers steigt während der Inkubation stetig. Allerdings nimmt gleichzeitig die Qualität der Oozyten, die für Photolysemessungen sehr wichtig ist, mit zunehmenden Alter und Expression ab. Eine Injektion von 20 ng RNA hat sich z. B. als unbrauchbar herausgestellt, da die damit injizierten Oozyten bereits am zweiten Tag eine durch die Expression des heterologen Proteins so stark geschädigte Membran aufwiesen, dass eine Verwendung für Photolyseexperimente unmöglich war.

## 2.3 Elektrophysiologische Untersuchungen mit der Patch-Clamp-Technik

Die elektrophysiologischen Messungen sowohl am heterolog exprimierten  $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ -Austauscher als auch an den endogenen  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanälen wurden mit der Giant-Patch-Clamp-Technik in der „inside-out“-Konfiguration durchgeführt. Damit war die intrazelluläre Membranseite für  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrations sprünge frei zugänglich. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrations sprünge wurden neben dem Lösungswechsel insbesondere mittels Photolyse von „caged Calcium“ ( $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator mit einer photolabilen Schutzgruppe) durchgeführt. Im folgenden soll nun der Patch-Clamp-Messplatz vorgestellt werden. Da die elektronischen Komponenten des Patch-Clamp-Verstärkers sowie die photolytische Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  für die Messungen mit hoher Zeitauflösung eine besondere Rolle spielen, wird auf sie gesondert eingegangen.

### 2.3.1 Der Patch-Clamp-Messplatz

#### Beschreibung des Messplatzes

Eine schematische Darstellung des Patch-Clamp-Messplatzes zeigt Abbildung 2.2. Zentrales Gerät des Messplatzes ist ein inverses Mikroskop, das sich auf einem schwingungsgedämpften Tisch befindet. Die Tischplatte besteht aus zwei Steinplatten und einer Stahlplatte mit einem Gesamtgewicht von mehr als 200 kg, so dass eine gute Entkopplung der Tischfläche von den Gebäudeschwingungen erreicht wird. Der schwingungsgedämpfte



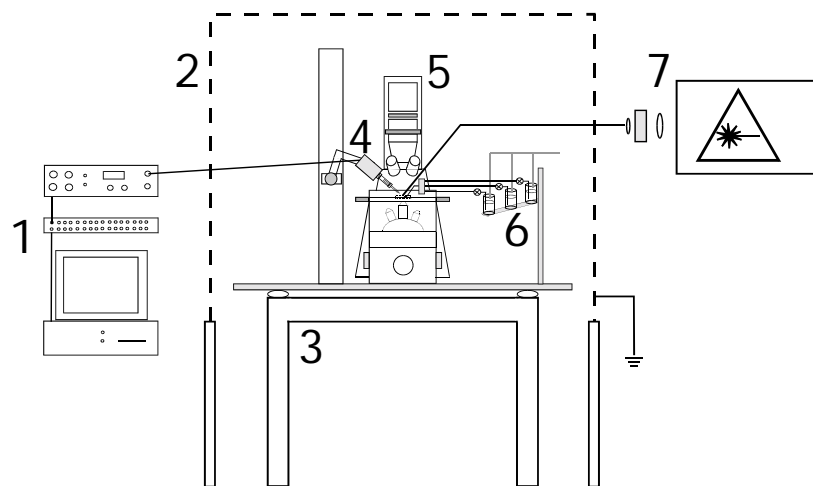


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des Patch-Clamp-Messplatzes

(1) Patch-Clamp-Verstärker mit AD/DA-Wandler und Computer zur Datenerfassung und Messplatzkontrolle (2) Faradaykäfig (3) schwingungsgedämpfter Tisch (4) Patch-Clamp-Vorverstärker mit Pipettenhalter (5) inverses Mikroskop (6) Lösungsgefäße mit Elektromagnetventilen (7) Excimer-Laser mit Farbstoffküvette und Fasereinkopplung

Tisch samt den auf ihn befindlichen Komponenten befindet sich innerhalb eines Faradaykäfigs, der die hochempfindliche Messapparatur vor elektromagnetischer Einstrahlung, insbesondere der 50 Hz Netzfrequenz, schützen soll. Alle elektrisch leitenden Komponenten wie Tischplatte, Mikroskoptisch, Mikroskopgehäuse sind gemeinsam mit dem Faradaykäfig geerdet und mit dem Erdungseingang des Patch-Clamp-Verstärkers verbunden. Außerhalb des Faraday-Käfigs befinden sich der Patch-Clamp-Verstärker, die Computer mit AD/DA-Wandler zur Datenerfassung, die Ventilsteuerung für die Lösungswechselzufuhr sowie der Excimerlaser samt Farbstoffküvette und Fasereinkopplung.

Links neben dem Mikroskop befindet sich, an einer Aluminiumsäule befestigt, der Patch-Clamp-Vorverstärker („Headstage“). Die Headstage kann über einen hydraulischen Mikromanipulator frei bewegt werden. An die Headstage wird der Patchpipettenhalter samt  $\text{Ag}^+/\text{Ag}^+\text{-Cl}^-$ -Elektrode und mit Lösung gefüllter Patchpipette angeschlossen. Seitlich am Pipettenhalter befindet sich ein Stutzen, der es erlaubt, den Druck im Halter über eine Wassersäule zu kontrollieren. Über eine Glasspritze kann sowohl Unter- als auch Überdruck im Halter angelegt werden. Dies ist für die Ausbildung eines Gigaseals wichtig.

Rechts neben dem Mikroskop befinden sich neun Eppendorf-Cryogefäße, die die Testlösungen für Lösungswechselexperimente aufnehmen. Der Lösungsfluss erfolgt durch leichten Überdruck und wird über elektromagnetische Ventile gesteuert. Die Schläuche der einzelnen Lösungen vereinigen sich kurz vor der eigentlichen Messkammer in einem Mikrolösungswechselverteiler, der ein sehr kleines Totvolumen von wenigen Mikrolitern aufweist. Da nur Schläuche mit sehr kleinem Innendurchmesser ( $\varnothing 0.28 \text{ mm}$ ) und damit ebenfalls sehr geringem Totvolumen verwendet werden, reicht das Volumen der Cryogefäße von 2.5 ml für mehrere Experimente aus. Dabei kann im Vergleich zu früheren

Lösungswechselsystemen der Durchsatz an Lösungen wesentlich reduziert werden, was sich besonders in Hinblick auf die Verwendung von photolabilen Substanzen als großer Vorteil erweist, da diese in der Regel sehr kostspielig sind.

In einer Vertiefung im Mikroskoptisch befindet sich ein mit Lösung gefülltes Glaspetrischälchen, in dem die Lösungszufuhr in Form einer Quarzkapillare ( $\varnothing 450 \mu\text{m}$ ), mündet. Eine Lichtleitfaser ist im rechten Winkel zu dieser Kapillare angeordnet (siehe Abbildung 2.3). Die Belichtung erfolgt durch die Quarzglaskapillare hindurch. Dabei befindet sich die Patchpipette innerhalb der Kapillare im Lichtkegel der Lichtleitfaser.

Der elektrische Kontakt der Badlösung mit der Referenzelektrode des Patch-Clamp-Vorverstärkers erfolgt über ein kleines KCl-Becken (gefüllt mit 0.5 M KCl) auf dem Mikroskoptisch, das über eine Salzbrücke mit der Badlösung verbunden ist. Die Salzbrücke soll Änderungen des Übergangspotentials zwischen Badlösung und der Referenzelektrode verhindern (Barry und Lynch, 1991, Neher, 1992, Neher, 1995).

Ein Austausch des gesamten Schälchenvolumens bei einem Lösungswechsel- bzw. Photolyseexperiment ist bei dieser Messanordnung nicht nötig, da sich der Patch bei laufender Lösungszufuhr im Lösungsstrom befindet. Die Diffusion ist durch die Wände der Glaskapillare räumlich stark eingeschränkt, sodass nach Abschalten der Lösungszufuhr während eines Photolyseexperiments einige hundert Millisekunden stationäre Bedingungen (stehende Lösung) herrschen.

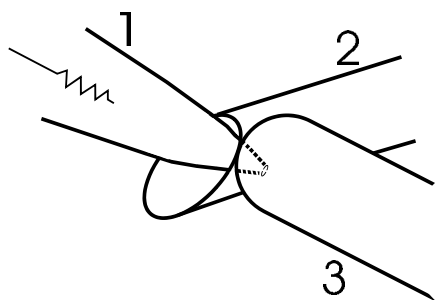


Abbildung 2.3: Skizze der verwendeten Messanordnung  
Schematische Anordnung von Patchpipette (1), Quarzkapillare für Lösungszufuhr (2) und Lichtleitfaser (3). Die Spitze der Patchpipette mit dem Membranflecken befindet sich innerhalb der Lösungszufuhrkapillare. Die Belichtung erfolgt durch die Quarzkapillare hindurch.

## Herstellung der Patchpipetten

Zur Herstellung der Patchpipetten wurden dickwandige Borosilikatglaskapillaren (Clark GC150-7.5, ID 0.86 mm, AD 1.5 mm) verwendet. Da diese dickwandigen Kapillaren nicht geeignet sind, um mit einem Pipettenziehgerät direkt auf den für Giant-Patch-Pipetten gewünschten Durchmesser von 15 bis 25  $\mu\text{m}$  gezogen zu werden, wurde eine andere in der Literatur beschriebene Methode verwendet (Rettinger, 1994, Hilgemann, 1995):

Die dickwandigen Kapillaren werden auf einem programmierbaren, elektronischen Vertikalpuller (Zeitz DMZ Universalpuller) mit drei Zügen auf einen kleinen Öffnungsdurchmesser ( $\varnothing 1 \mu\text{m}$ ) mit steilen Flanken („großer Taper“) ausgezogen. Die Pipetten werden dann unter einem als Mikroschmiede dienenden Mikroskop eingespannt. Auf einem stromdurchflossenen Platindraht in dieser Mikroschmiede befindet sich ein Tropfen aus Blei-Borat-Glas (Lotglas, Schmelzpunkt ca. 500°C). Der Platindraht wird zum Glühen gebracht, so dass der Glastropfen gerade zu schmelzen anfängt. Über einen Mikromanipulator wird die spitz ausgezogene Pipettenspitze in den flüssigen Glastropfen hineinge-

fahren. Da das Borosilikatglas der Pipetten einen höheren Schmelzpunkt aufweist, steigt das Lotglas durch Kapillarkräfte nur in und an der Pipettenspitze hoch, ohne diese selbst anzuschmelzen. Über ein Messokular wird dieser Vorgang kontrolliert und abgebrochen, wenn das Lotglas bis zum gewünschten Pipettendurchmesser hochgestiegen ist. Durch Erkalten zieht sich der Lotglastropfen zusammen und bricht die Pipettenspitze am Meniskus ab. Diese stumpfe Pipettenspitze wird anschließend hitzepoliert, indem sie an den nun stärker erhitzten Lotglastropfen angenähert wird, ohne diesen zu berühren.

Mit dieser Methode können Pipettendurchmesser von typisch  $20 \pm 2 \mu\text{m}$  und großen Wandstärken mit hoher Präzision gezogen werden. Diese dickwandigen Pipettenspitzen zeichnen sich dabei durch gute Seal-Eigenschaften aus. Zudem sind sie im Vergleich zu dünnwandigen Pipettenspitzen gleichen Öffnungsdurchmessers wesentlich rauschärmer, da sie aufgrund der höheren Wandstärke des Glases eine deutlich geringere Kapazität aufweisen.

### Herstellung der $\text{Ag}^+/\text{Ag}^+\text{-Cl}^-$ -Elektroden

Die  $\text{Ag}^+/\text{Ag}^+\text{-Cl}^-$ -Elektroden werden aus Silberdraht mit einem Durchmesser von 0.25 mm (Pipettenelektroden) bzw. 1 mm (Referenzelektrode) hergestellt. Der Silberdraht wird mit Sandpapier geschmiergelt, in 65%iger Salpetersäure gereinigt und dann in 0.1 M HCl-Lösung bei einem Strom von  $150 \mu\text{A}$  für 6 bis 8 Stunden per Elektrolyse chloriert. Als Kathode wird ein ausgeglühtes Platinblech verwendet.

### Herstellung der Salzbrücken

Die Salzbrücken werden aus Glasröhrchen (Salzbrücke zur Referenzelektrode) bzw. aus Quarzkapillaren (Salzbrücke zur Pipettenelektrode für chloridfreie Messungen) hergestellt, die mit einem Gel aus 3% Agarose und 0.5 M KCl befüllt werden. Die Glasröhrchen haben einen relativ großen Innendurchmesser von 1.6 mm, sodass die Salzbrücken nur einen kleinen Widerstand aufweisen und somit nicht zum limitierenden Faktor bei der Zeitauflösung der Messapparatur werden. Da bei den Pipettenelektroden aus Platzgründen nur Quarzkapillaren mit einem Innendurchmesser von  $350 \mu\text{m}$  als Salzbrücken verwendet können, muss hier darauf geachtet werden, dass die Übergangslänge zwischen  $\text{Ag}^+/\text{Ag}^+\text{-Cl}^-$ -Elektrode und Pipettenlösung möglichst gering ist.

Der Zugangswiderstand lag typischerweise bei 0.8 bis 1 M $\Omega$  bei Verwendung chloridfreier Lösungen und Pipettenöffnungsdurchmessern von  $\approx 18 \mu\text{m}$ . Der Widerstand war damit um einen Faktor 4 bis 5 höher als bei Verwendung chloridhaltiger Lösungen und ohne Salzbrücke auf der Pipettenelektrode.

## 2.3.2 Durchführung eines Patch-Clamp-Experimentes an *Xenopus* Oozyten

### Vorbereitung der Oozyten

Vor dem eigentlichen Patch-Clamp-Experiment muss die Vitellinschicht der Oozyte entfernt werden, da sonst die Ausbildung eines Gigaohmseals nicht möglich ist. Hierzu wird

die Oozyte in eine hypertonische „Shrink-Lösung“ (ORI mit 250 mM K-MES) verbracht, um durch osmotisch bedingtes Schrumpfen der Zelle die Vitellinschicht von der Zellmembran zu lösen. Die Vitellinschicht, die durch ihr charakteristisches Glänzen bei indirekter Beleuchtung unter dem Binokular erkennbar ist, wird anschließend mechanisch entfernt: Mit zwei spitz angeschliffenen Uhrmacherpinzetten wird die Vitellinschicht eingerissen und dann vorsichtig abgezogen. Die devitellinisierte Oozyte ist sehr empfindlich gegen Kontakt mit Luft sowie Scherkräften und platzt nach einigen Stunden unter ihrem eigenen Gewicht.

### Durchführung des Patch-Clamp-Experimentes

Zur Durchführung einer Patch-Clamp-Messung wird die devitellinisierte Oozyte in das mit der sogenannten „Seal-Lösung“ gefüllte Messschälchen im Mikroskoptisch gesetzt. Die „Seal-Lösung“ hat sich durch ihre Zusammensetzung als besonders geeignet zur Ausbildung eines Gigaohmseals herausgestellt. Um ein Aktivieren der  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanäle nach Erreichen eines Inside-out-Patches zu vermeiden, enthält diese Lösung kein freies  $\text{Ca}^{2+}$ . Zudem wurde für die Photolysemessungen der Gehalt an  $\text{Mg}^{2+}$  und an EGTA reduziert, um jeglich mögliche Kontamination der „Caged-Calcium“-Lösungen zu minimieren. Die Lösungswechselbehälter wurden zuvor mit den Testsubstanzen befüllt und sämtliche Schläuche und Ventile mit den Lösungen gespült.

Eine Patch-Pipette wird dann von hinten mittels einer Kapillare blasenfrei mit einer Pipettenlösung befüllt und in den Pipettenhalter eingespannt. Auf den Pipettenhalter und damit auf die Patch-Pipette wird ein leichter Überdruck (ca. ein Zentimeter auf der Kontroll-Wassersäule) angelegt. Dadurch wird bei Eintauchen der Pipettenspitze in die Seallösung eine Verunreinigung der Pipette durch Schmutzpartikel auf der Lösungsoberfläche sowie eine Kontamination der Pipettenlösung mit der Seallösung vermieden. Nach Eintauchen der Pipette in die Badlösung erfolgt ein Abgleich auftretender Potentialdifferenzen zwischen Mess- und Referenzelektrode auf Null mit dem Offset-Regler des Patch-Clamp-Verstärkers. Übergangspotentiale an Lösungsgrenzschichten (Barry und Lynch, 1991, Neher, 1992, Neher, 1995) werden, sofern notwendig, nachträglich korrigiert. Hierzu dient ein in der Clampex 8.0-Software enthaltenes Programm zur Berechnung von Übergangspotentialen. Der Pipettenwiderstand kann nach Eintauchen der Pipette in die Badlösung über die „Seal-Test“-Funktion (Testpuls: 5 mV, 10 ms) der Clampex-Software kontrolliert werden. Anschließend wird die Pipette vorsichtig an die Oozytenmembran angenähert. Durch den Überdruck auf der Pipettenlösung werden eventuell auf der Membranoberfläche haftende Schmutzpartikel fortgespült. Zur Ausbildung eines Gigaohmseals wird die Pipette auf die Membran gesetzt und der Überdruck auf der Pipette wird durch einen leichten Unterdruck (ca. 2 cm auf der Wassersäule) ersetzt. Innerhalb von 30 Sekunden bis zwei Minuten kann ein Abdichtwiderstand von mindestens ein Gigaohm erreicht werden. Wenn nach spätestens drei Minuten sich kein Gigaohmseal ausgebildet hat, wird der Versuch abgebrochen und eine neue Patchpipette bzw. eine neue Oozyte getestet.

Nach der Etablierung des Gigaohmseals wird die Patchpipette langsam zurückgezogen und dabei z.T. seitlich bewegt, um ein sauberes Herausreißen des Membranflecks aus der Oozytenmembran zu gewährleisten. Die Patchpipette mit dem „inside-out“-Patch

wird dann vorsichtig in eine Position vor die Lichtleitfaser und der Lösungszufuhr gefahren. Es können nun sowohl Lösungswechsel- als auch Photolyseexperimente am Patch durchgeführt werden. Hierzu wird eines der Ventile der Lösungszufuhr, manuell oder per Computer gesteuert, geöffnet und die jeweilige Lösung über den Patch perfundiert. Für die Photolysemessungen wird der Patch mit der DM-Nitrophen-Lösung equilibriert und dann bei stehender Lösung ein Laserpuls in das Messvolumen eingekoppelt, um so einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung durchzuführen. Die Lösungswechsel- und Photolyseexperimente können mit Software-gesteuerten Spannungsprotokollen zur Einstellung des Membranpotentials kombiniert werden.

Während des Experimentes wird der Sealwiderstand durch Applizieren eines Spannungspulses mehrmals kontrolliert, um die Stabilität und damit die Verlässlichkeit des gemessenen Signals zu gewährleisten. Ein Gigaohmseal ist bei einem reinen Lösungswechselexperiment bis zu einer Stunde stabil; bei Spannungssprung- und Photolyseexperimenten nimmt die Qualität des Membranfleckens dagegen deutlich ab. Bei der Mehrzahl der Photolyseexperimente (> 90%) ist das Gigaohmseal bereits bei der ersten Belichtung mit einer relativ niedrigen Laserenergie zusammengebrochen, insbesondere wenn Dotterpartikel am Patch hafteten. Die Dotterpartikel machen den Patch für Photolysemessungen unbrauchbar, da die Dotterpartikel offenbar zu viel Laserlicht absorbieren und so zum Zerreißen des Patches führen.

Zusätzlich werden die kapazitiven Komponenten des Stroms, die auf die Pipettenkapazität zurückzuführen sind, mit der Kompensationsfunktion des Patch-Clamp-Verstärkers abgeglichen. Eine Beschichtung der Pipettenspitze mit einem Gemisch aus Parafilm, Mineralöl und Vitamin E-Azetat zur Verbesserung der kapazitiven Eigenschaften der Patchpipetten (Hilgemann, 1995) hat sich als nicht notwendig herausgestellt, da das dickwandige Pipettenglas bereits sehr gute kapazitive Eigenschaften aufweist und hier keine deutliche Verbesserung erreicht werden konnte. Ebenso hatte ein Benetzen der Patchpipettenspitze mit Vitamin-E-Azetat (Collins et al., 1992) keine Verbesserung der Sealeigenschaften der Patchpipetten zur Folge.

### 2.3.3 Elektrische Eigenschaften des Patch-Clamp-Messsystems

Ein Patch-Clamp-Verstärker soll das Membranpotential kontrollieren („Voltage-Clamp“) und den dazu notwendigen Kompensationsstrom messen. Dies geschieht über eine einzelne Elektrode, die sowohl für die Spannungsmessung als auch die Strominjektion verantwortlich ist. Der Patch-Clamp-Verstärker soll eine sehr hohe Verstärkung bei möglichst geringem Rauschen, aber gleichzeitig hoher Bandbreite liefern. Hierzu wird ein hochempfindlicher Vorverstärker („Headstage“) möglichst nahe an die Messpipette gebracht. Bei der elektronischen Realisierung wird auf integrierte Schaltungen (ICs) weitestgehend verzichtet bzw. eine hybride Bauweise verwendet, da ICs meist ein wesentlich größeres Rauschen aufweisen als konventionelle Bauteile. So werden für die Operationsverstärker sehr rauscharme Sperrschicht-Feldeffekttransistoren (JFETs) verwendet.

Zwei häufig anzutreffende Realisierungen eines Patch-Clamp-Vorverstärkers sind vereinfacht in Abbildung 2.4A und B dargestellt. In Abbildung 2.4A ist der Vorverstärker mit einer resistiven Rückkopplung realisiert worden. Der Operationsverstärker OPA1 stellt

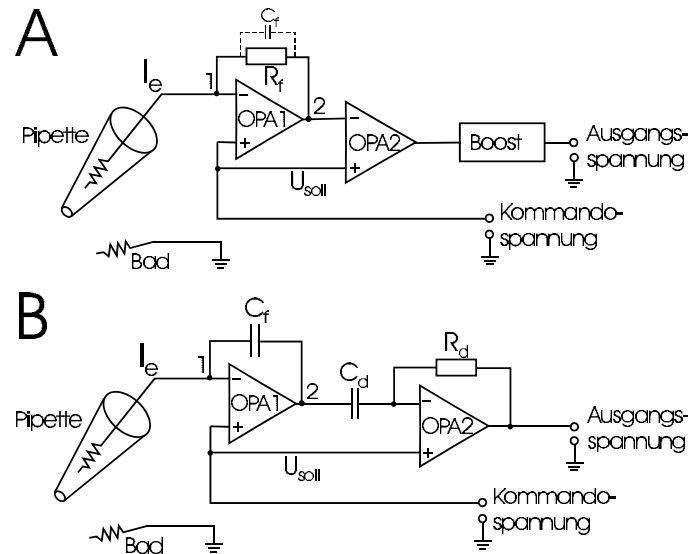


Abbildung 2.4: Schaltbilder des Patch-Clamp-Vorverstärkers

A resistiver Betriebsmodus des Vorverstärkers: Operationsverstärker OPA1 mit dem Rückkopplungswiderstand  $R_f$  arbeitet als Strom-Spannungswandler. Der nachgeschaltete Operationsverstärker OPA2 arbeitet als Differenzverstärker, der die Kommandospannung wieder vom Ausgangssignal des OPA1 abzieht. Die Ausgangsspannung des OPA2 ist damit nur dem Eingangsstrom  $I_e$  proportional, hat allerdings eine sehr geringe Bandbreite. Mit dem nachfolgenden Booster-Schaltkreis wird diese erhöht.

B kapazitiver Betriebsmodus: Operationsverstärker OPA1 mit dem Rückkopplungskondensator  $C_f$  arbeitet als Integrator. Mit dem nachgeschalteten Differenzierer, bestehend aus OPA2, Kondensator  $C_d$ , Rückkopplungswiderstand  $R_d$ , wird eine Ausgangsspannung am OPA2 erzeugt, die wieder proportional zur Eingangsspannung  $I_e$  ist.

zusammen mit dem Rückkopplungswiderstand  $R_f$  einen Strom-Spannungswandler dar. Durch die negative Rückkopplung wird das Ausgangssignal des Operationsverstärkers unabhängig von den Eigenschaften des Operationsverstärkers selbst. Ein Eingangsstrom  $I_e$  kann aufgrund des sehr hohen Eingangswiderstands des Operationsverstärkers nur über den Rückkopplungswiderstand fließen.

Am nicht-invertierenden Eingang des OPA1 liegt die Kommandospannung  $U_{\text{soll}}$  an, auf die das Membranpotential geklemmt werden soll. Ein Unterschied zwischen dieser Sollspannung und der am invertierenden Eingang über die Messelektrode anliegenden Spannung führt zu einer Potentialdifferenz zwischen dem invertierenden Eingang und dem Ausgang des Operationsverstärkers (Punkte 1 und 2 in der Abbildung). Als Folge dessen wird über den Rückkopplungswiderstand  $R_f$  ein Strom injiziert, der dem Eingangsstrom  $I_e$  entgegengesetzt gleich ist (Knotenregel). Es gilt daher für die Ausgangsspannung des OPA1:  $U_{\text{aus}} = -I_e \cdot R_f$ . Die Ausgangsspannung ist also proportional dem Eingangsstrom des Operationsverstärkers. Der nachgeschaltete Operationsverstärker OPA2 arbeitet als Differenzverstärker, der die Klemmspannung  $U_{\text{soll}}$  vom Ausgangssignal des OPA1 subtrahiert.

Um hohe Verstärkungsfaktoren zu erreichen, wird der Rückkopplungswiderstand  $R_f$  möglichst groß gewählt. Für Einzelkanalmessungen sind Werte von  $50 \text{ G}\Omega$  typisch, für

Ganzzellmessungen 0.5 bis 1 G $\Omega$  (beim Axopatch 200B 50 bzw. 500 M $\Omega$ ). Allerdings besitzen die Widerstände immer auch eine kapazitive Eigenschaft (in Abbildung 2.4A gestrichelt eingezeichnet). Dadurch ist die Bandbreite dieser Schaltung limitiert, da gilt:  $f = 1/(2\pi \cdot R_f \cdot C_f)$ . Bei einem 50 G $\Omega$ -Widerstand und einer typischen Streukapazität von 0.1 pF beträgt diese Bandbreite nur 32 Hz. Mit nachgeschalteten Verstärkern („Booster“) muss der hochfrequente Signalanteil wiederhergestellt werden.

Ein weiterer Nachteil der resistiven Rückkopplungsschaltung ist das Eigenrauschen des Rückkopplungswiderstands. Um trotzdem Bandbreiten größer 20 kHz zu erreichen, wird deshalb eine kapazitive Rückkopplung bevorzugt (siehe Abbildung 2.4B): Als Rückkopplungselement wird ein Kondensator  $C_f$  verwendet, der nur ein sehr geringes Eigenrauschen und eine hohe Linearität aufweist. Der Operationsverstärker OPA1 arbeitet daher als Integrator. Die Ausgangsspannung  $U_{\text{OPA1}}$  ist dem Integral des Eingangsstroms  $I_e$  proportional:  $U_{\text{OPA1}} = U_0 - C_f^{-1} \cdot \int_0^t I_e(t') dt'$ .  $U_0$  ist proportional zur Anfangsladung des Kondensators. Dieser muss regelmäßig entladen werden, um eine Sättigung zu vermeiden. Beim Axopatch 200 wird dies über eine Reset-Schaltung realisiert, die automatisch den Rückkopplungskondensator entlädt, wenn mehr als 10 pC Ladungen in die Membran injiziert werden müssen. Um eine zum Eingangsstrom proportionale Ausgangsspannung zu erhalten, ist dem OPA1 ein Differenzierglied bestehend aus OPA2, Kondensator  $C_d$ , Widerstand  $R_d$ , nachgeschaltet. Damit ist die Ausgangsspannung des OPA2 proportional zum Eingangsstrom:  $U_{\text{aus}} = I_e \cdot R_d \cdot (C_d/C_f)$ .

Um den Vorteil des geringen Eigenrauschens des Kondensators nutzen zu können, muss dessen Kapazität sehr klein ( $\ll 10$  pF) gewählt werden. Typisch sind daher Werte für  $C_f$  von 1 pF. Zudem müssen alle anderen Eingangskapazitäten minimiert werden, da diese sich zur Kapazität des Rückkopplungskondensators aufaddieren. Daher sollten möglichst rauscharme Pipettengläser (evtl. beschichtet mit Sylgard) und Pipettenhalter (z.B. aus Teflon) verwendet werden.

Neben diesen Eigenschaften des Verstärkers beeinflusst auch das Messobjekt selbst das Messergebnis. Ein Membranpatch besitzt eine Kapazität  $C_M$  und einen Widerstand  $R_M$ , die zusammen mit Zugangswiderstand  $R_A$  das elektrische Verhalten bestimmen. Der Zugangswiderstand (auch Serienwiderstand genannt) bezeichnet den Widerstand zwischen Verstärkereingang und Membran. Er wird hauptsächlich durch die Geometrie der Pipettenspitze (insbesondere durch den Öffnungsdurchmesser) bestimmt. Da ein Teil der Klemmspannung immer über dem Zugangswiderstand abfällt, sollte dieser möglichst klein gehalten werden. Ansonsten kann das tatsächliche Haltepotential an der Membran vom Sollwert deutlich abweichen.

Ein Ersatzschaltbild der elektrischen Eigenschaften eines Membranpatches samt Patchpipette ist in Abbildung 2.5 dargestellt. Der Zugangswiderstand  $R_A$  und der Membranwiderstand  $R_M$  lassen sich über einen Parallelwiderstand  $R_P$  ausdrücken:

$$R_P = \frac{R_M \cdot R_A}{R_M + R_A}$$

Für einen großen Membran- bzw. Abdichtwiderstand (da Membran- und Abdichtwiderstand messtechnisch nicht getrennt werden können, werden hier beide äquivalent benutzt) und kleinen Zugangswiderstand gilt näherungsweise:  $R_P = R_A$ . Damit bilden  $R_A$  und die

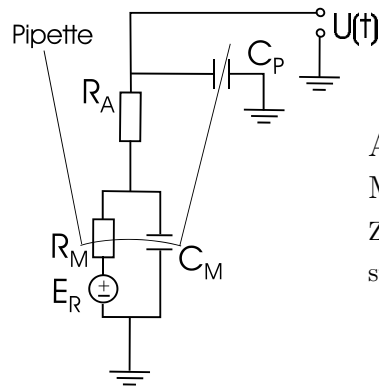


Abbildung 2.5: Ersatzschaltbild einer Patchpipette mit einem Membranpatch

Zugangswiderstand:  $R_A$ , Pipettenkapazität:  $C_P$ , Membranwiderstand:  $R_M$ , Membrankapazität:  $C_M$ , Ruhepotential der Zellmembran:  $E_R$

Membrankapazität  $C_M$  einen Tiefpassfilter mit der Grenzfrequenz  $f = 1/(2\pi \cdot R_A \cdot C_M)$ . Dadurch wird die Bandbreite der Messung bei großen Membrankapazitäten und Zugangswiderständen z.T. stark eingeschränkt. Bei der Interpretation von Spannungssprungexperimenten ist zudem die Zeit zum Umladen der Membrankapazität von Bedeutung. Diese kann bei zeitaufgelösten Messungen limitierend sein und ist bestimmt durch:  $\tau = R_A \cdot C_M$ . Bei Makropatch-Messungen mit Zugangswiderständen  $< 1 \text{ M}\Omega$  und Membrankapazitäten von ca.  $10 \text{ pF}$  können in der Regel hohe Zeitaufösungen und Bandbreiten erreicht werden. Zudem besitzen Patch-Clamp-Verstärker Kompensationsschaltungen zum Ausgleich des Zugangswiderstandes, der Membrankapazität und der Pipettenkapazität.

Neben den elektrischen Eigenschaften des Vorverstärkers und des Messobjekts beeinflusst auch die Wahl des richtigen Tiefpassfilters am Hauptverstärker die Messung. Die gebräuchlichsten mehrpoligen, aktiven Filtercharakteristiken sind: elliptisch, Cauer, Chebyshev, Bessel und Butterworth. Die beiden letztgenannten werden häufig in Patch-Clamp-Verstärkern eingesetzt und sind in Abbildung 2.6A und B dargestellt. Im Axopatch 200B wird ein 4-Pol-Besselfilter verwendet. Der Besselfilter hat zwar ein schlechteres

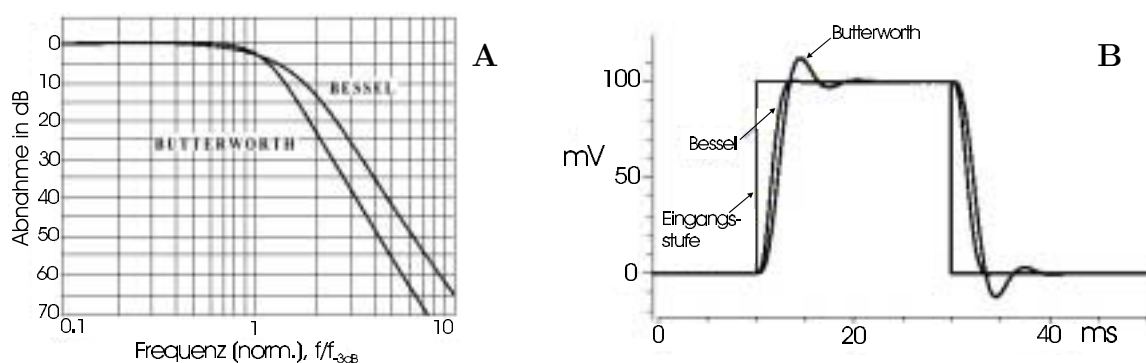


Abbildung 2.6: Eigenschaften eines 4-Pol Bessel- und Butterworthfilters

A Der 4-Pol-Butterworthfilter zeigt bessere Frequenzeigenschaften als der 4-Pol-Besselfilter: Im Durchgangsbereich verläuft er deutlich flacher und fällt dann nahe der Grenzfrequenz steiler ab als der Besselfilter. B Das zeitliche Verhalten des Butterworthfilter ist dagegen deutlich schlechter: Er zeigt bei einer Eingangsstufe deutliche Überschwinger im Vergleich zum Besselfilter. Zu erkennen ist auch die zeitliche Verschiebung des gefilterten Signals im Vergleich zur Eingangsstufe (Abbildungen modifiziert nach: The Axon Guide, Axon Instruments, Inc.)



Frequenzverhalten als der Butterworthfilter, zeigt dagegen aber ein besseres Zeitverhalten: Im Gegensatz zum Butterworthfilter treten bei einem schnell ansteigenden Eingangssignal nur minimale Überschwinger auf, weshalb der Besselfilter bei Patch-Clamp-Experimenten oft bevorzugt wird.

Zur Kennzeichnung eines Filters wird in der Regel die Grenzfrequenz  $f_{-3}$  angegeben, bei der die Spannung eines Eingangssignals um 3 dB (auf  $\sqrt{0.5}=0.7071$ ) abgefallen ist. Anschaulicher ist oftmals die Anstiegszeit von 10% auf 90% der Signalamplitude, für die näherungsweise gilt:  $t_{10-90} \approx 0.3/f_{-3}$ . Als allgemeine Regel ergibt sich die Anstiegszeit des gefilterten Signals  $t_r$  aus der Anstiegszeit des Eingangssignals  $t_s$  und der Anstiegszeit des Filters  $t_f$ :

$$t_r = \sqrt{t_s^2 + t_f^2}$$

Damit lässt sich abschätzen, inwieweit das Ausgangssignal durch den Filter beeinflusst wurde.

Ebenso führt die Filterung zu einer Verzögerung des gefilterten Signals im Vergleich zum ursprünglichen Signal, wie in Abbildung 2.6B zu erkennen ist. Diese Verzögerung muss bei einer zeitlichen Zuordnung des gemessenen Signals berücksichtigt werden. Bei einem 4-Pol-Besselfilter beträgt diese Verzögerung näherungsweise  $0.33/f_{-3}$ .

### 2.3.4 Photolyse von DM-Nitrophen

$\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrations sprünge per herkömmlichen Lösungswechsel erlauben nur eine begrenzte Zeitauflösung bis maximal in den Millisekundenbereich. Da dies für die Messungen in dieser Arbeit nicht ausreichend gewesen wäre, wurden die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrations sprünge mittels Photolyse von sogenanntem „Caged Calcium“ durchgeführt. Bei diesen „Caged Calcium“-Substanzen handelt es sich um photolabile  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelatoren, deren Affinität für  $\text{Ca}^{2+}$  nach Photolyse durch UV-Licht abnimmt. Bedingt durch die niedrigere Affinität nach der Belichtung wird zuvor gebundenes  $\text{Ca}^{2+}$  freigesetzt und damit ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrations sprung hervorgerufen. Bekannte „Caged Calcium“-Substanzen sind die BAPTA-Derivate der *Nitr*-Reihe (Tsien und Zucker, 1986, Kaplan, 1990, Adams und Tsien, 1993) und das EGTA-Derivat *Nitrophenyl-EGTA* (Ellis-Davies und Kaplan, 1994). In der vorliegenden Arbeit wurde *DM-Nitrophen* (DMN) eingesetzt. Dabei handelt es sich um ein EDTA-Derivat, das mit einer photolabilen 4,5-Dimethoxy-2-Nitrophenyl-Gruppe versehen ist (siehe Abbildung 2.7). DM-Nitrophen wurde 1988 von J. Kaplan und G. Ellis-Davies entwickelt (Kaplan und Ellis-Davies, 1988). Unter Belichtung mit UV-Licht (Absorptionsmaximum  $\lambda = 348 \text{ nm}$ , Extinktionskoeffizient  $\epsilon_{348} = 4200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  bei pH 7.2, Quantenausbeute 18%) ändert sich die  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität von 5 nM auf 3 mM. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung erfolgt mit einer Rate von mindestens  $38000 \text{ s}^{-1}$  (Ellis-Davies et al., 1996). Damit sind  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrations sprünge mit einer Zeitauflösung unter  $100 \mu\text{s}$  möglich. DM-Nitrophen und seine Photolyseprodukte haben sich in früheren Experimenten als inert gegenüber dem untersuchten Membranprotein gezeigt (Kappl und Hartung, 1996a, b). Mit diesen Eigenschaften ist DM-Nitrophen hervorragend geeignet für die Untersuchung der schnellen Kinetik des  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers.

Allerdings muss bei den Messungen darauf geachtet werden, dass die Beladung des

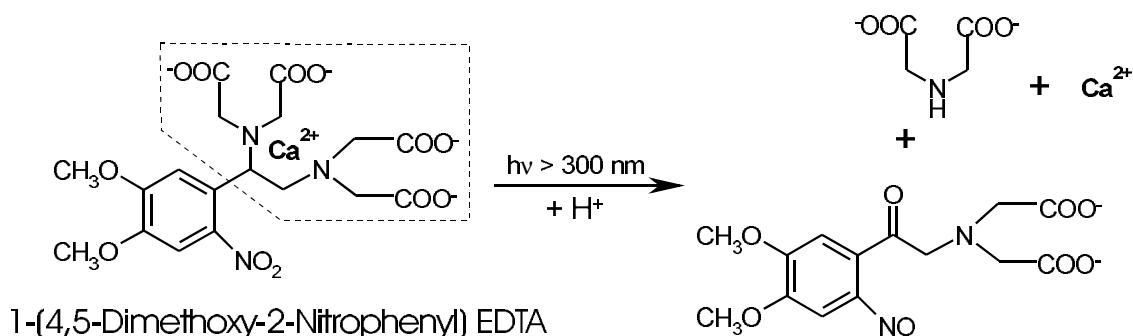


Abbildung 2.7: Photolyse-Reaktion von DM-Nitrophen

Im linken Teil ist die Struktur von DM-Nitrophen dargestellt. Die EDTA-Gruppe ist durch die gestrichelte Linie hervorgehoben. Nach der Absorption von UV-Licht kommt es zu einer Spaltung in dieser  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator-Struktur (rechter Bildteil) und damit einhergehend zu einer  $10^5$ -fachen Affinitätsniedrigung. Dies unterscheidet DM-Nitrophen von den photolabilen  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelatoren der *Nitr*-Reihe, bei denen lediglich eine Verschiebung der Elektronendichte weg von den Metall-bindenden Stickstoffatomen der Chelatorgruppe zu einer relativ schwachen  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinitätsniedrigung führt.

DM-Nitrophens mit  $\text{Ca}^{2+}$  sowie der Photolyseumsatz möglichst hoch sind. Andernfalls besteht die Gefahr, dass sich statt einer gewünschten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsstufe ein schneller transienter  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung („ $\text{Ca}^{2+}$ -Spike“) nach der Photolyse bildet (Zucker, 1993): Nicht photolysiertes,  $\text{Ca}^{2+}$ -unbeladenes DMN bindet das zuvor durch Photolyse des  $\text{Ca}^{2+}$ -beladenen DMNs freigesetzte  $\text{Ca}^{2+}$ . Das heißt, unmittelbar nach der Photolyse steigt das freie  $\text{Ca}^{2+}$  sehr schnell auf einen Maximalwert an, um dann wieder auf einen niedrigen stationären Wert abzufallen. Der Verlauf der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (Spitzenkonzentration und Zeitkonstante des Abfalls auf die stationäre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration) hängt stark vom Verhältnis des  $\text{Ca}^{2+}$ -beladenen zum  $\text{Ca}^{2+}$ -unbeladenen DM-Nitrophens sowie vom Anteil des photolysierten DMNs an der totalen DMN-Konzentration ab. Ersteres ist durch das freie  $\text{Ca}^{2+}$  in der Lösung vor der Photolyse limitiert: Dieses soll möglichst niedrig sein, um eine Aktivierung des Proteins vor dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung zu vermeiden. Bei einem  $K_D$ -Wert von 5 nM und einer gewünschten maximalen freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 100 bzw. 500 nM ist das DM-Nitrophen zu  $\geq 96\%$  bzw. zu  $\geq 99\%$  mit  $\text{Ca}^{2+}$  beladen. Der Photolyseumsatz (das heisst, der Anteil des DM-Nitrophens, der gespalten wird) ist dagegen durch die maximale Laserenergie, die ein Membranpatch aushält, und die Quantenausbeute des DM-Nitrophens begrenzt und liegt erfahrungsgemäß bei höchstens 15%. Eine zu hohe Laserenergie führt zu einer drastischen Verminderung des Abdichtwiderstands, die vermutlich auf teilweise Absorption und Dissipation der Laserenergie durch den Membranfleck zurückzuführen ist. Eine Simulation der Photolyse bei verschiedenen Photolyseumsätzen und  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladungen zeigt Abbildung 2.8. In der vorliegenden Arbeit wurden daher möglichst hohe Beladungen des DM-Nitrophens mit  $\text{Ca}^{2+}$  eingesetzt. Zudem wurde die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung nur in geringen Maße über die Laserenergie variiert. Stattdessen wurden verschiedene DMN-Konzentrationen eingesetzt, um bei den Messungen eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsabhängigkeit durchzuführen.

Als UV-Lichtquelle zur Photolyse von DM-Nitrophen wird ein XeCl-Excimerlaser

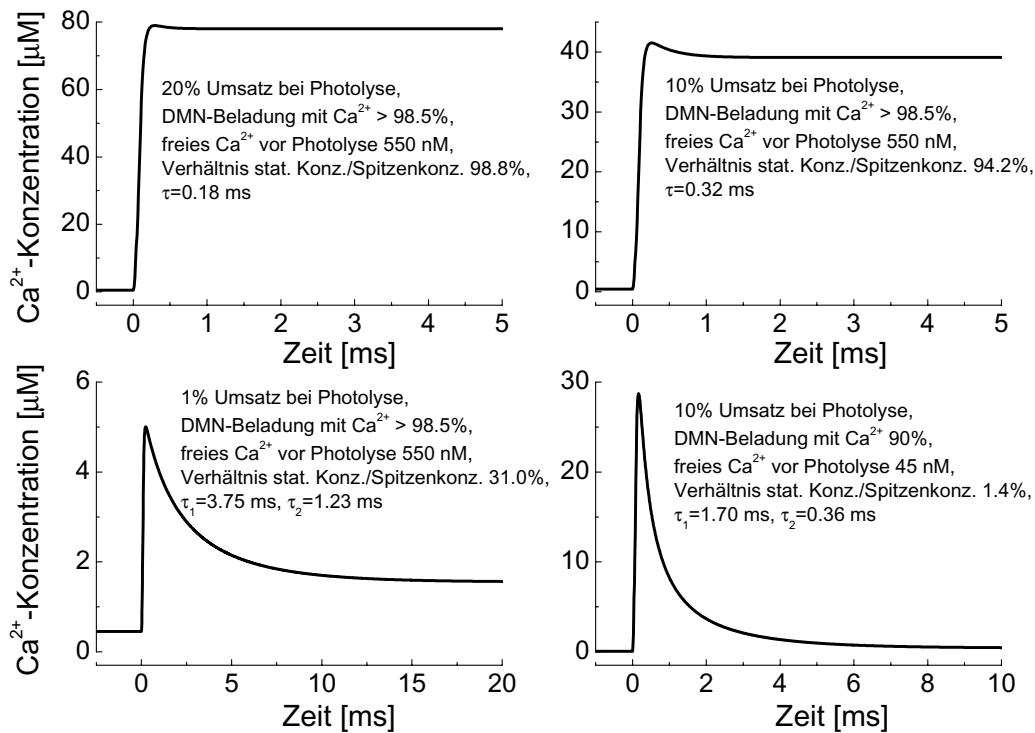


Abbildung 2.8: Simulation eines  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsanstiegs durch Photolyse von DMN. Dargestellt sind Simulationen eines  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsanstiegs bei einer hohen ( $> 98.5\%$ ) und einer niedrigen ( $90\%$ ) Beladung des DM-Nitrophenes mit  $\text{Ca}^{2+}$  sowie bei verschiedenen Photolyseraten. Es sind jeweils das Verhältnis der stationären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zur Spitzenkonzentration sowie die Zeitkonstanten des Konzentrationsabfalls angegeben. Bei einer hohen  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung und einer Photolyserate  $\geq 10\%$  ist die auftretende transiente  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration vernachlässigbar. Als Parameter für die Simulation wurden die von Ellis-Davies et al. angegebenen Raten für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung und -Dissoziation an DMN und dessen Photolyseprodukt angenommen (Ellis-Davies et al., 1996).

(Emissionswellenlänge  $\lambda = 308$  nm, maximale Pulsenergie 190 mJ, Pulslänge 18 ns) verwendet. Der UV-Laserpuls des Excimer-Laser kann entweder direkt zur Photolyse in eine Lichtleitfaser eingekoppelt werden oder er dient zur Anregung eines Farbstofflasers. Der Excimer-Laserpuls wird hierzu abgeschwächt und mit einer Zylinderlinse auf eine Quarzküvette abgebildet. Diese Küvette ist mit dem Laserfarbstoff BiBuQ (4, 4'''-Bis-(2-butyloxy)-p-quaterphenyl, 2 mM in Dioxan, Quantenausbeute 11% bei Anregung bei 308 nm (Brackmann, 1986)) gefüllt und dient als Farbstofflaser. Die Lösung wird mit einem Mikrorührer umgewälzt, da sich sonst bei schneller Pulsfrequenz Ausbleicheffekte zeigen. Dies wird durch starke Schwankungen in der Farbstofflaserenergie deutlich. Das Emissionsspektrum des Laserfarbstoffs BiBuQ gewährleistet noch eine ausreichende Photolyse von DM-Nitrophen (siehe Abbildung 2.9). Die Verwendung längerwelligen Anregunglichtes zur Photolyse gegenüber einer direkten Nutzung der Excimer-Laser-Wellenlänge hatte eine verbesserte Stabilität der Membranflecken bei der Photolyse zur Folge. Der rechtwinklig zur Anregung austretende Farbstofflaserpuls wird in eine Quarzglasfaser ( $\varnothing 400 \mu\text{m}$ ) eingekoppelt. Am Faserende können Energiedichten bis  $1.2 \text{ J/cm}^2$  erreicht werden, was

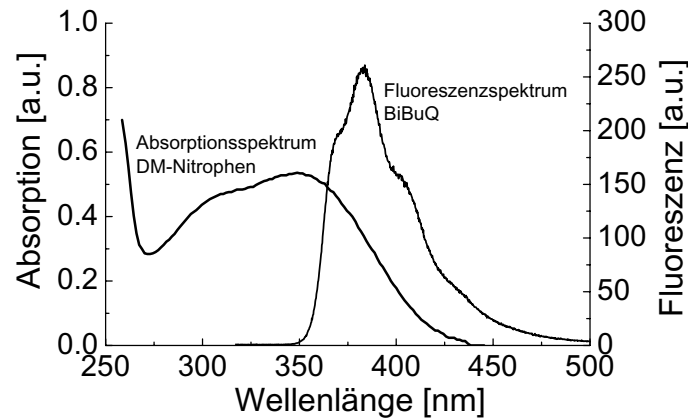


Abbildung 2.9: Absorptionsspektrum von DM-Nitrophen im Vergleich zum Fluoreszenzspektrum des Laserfarbstoffs BiBuQ

Das Absorptionsmaximum von DM-Nitrophen liegt bei  $\lambda = 348$  nm, das Fluoreszenzmaximum des Laserfarbstoffs BiBuQ bei  $\lambda = 385$  nm mit einer ausgeprägten Schulter bei  $\lambda = 370$  nm. Die Anregung des Laserfarbstoffs erfolgt bei 308 nm. Der Überlapp des Absorptionsspektrum von DM-Nitrophen und des Emissionsspektrum von BiBuQ ist hinreichend genug, um eine Photolyse von DM-Nitrophen zu gewährleisten. Durch die Verschiebung der Photolyse-Anregungswellenlänge von  $\lambda = 308$  nm (Emissionslinie des XeCl-Excimer-Lasers) zu höheren Wellenlängen konnte die Stabilität der Membranpatches erhöht werden.

für die Photolyseexperimente mehr als ausreichend ist. Diametral zur Fasereinkopplung befindet sich eine Photodiode. Mit ihr kann parallel zur Patch-Clamp-Messung die relative Energie des Farbstofflaserpulses gemessen werden. Mittels einer zuvor erstellten Kalibrierungskurve (siehe Abbildung 2.10) können so Schwankungen der Laserenergie bei der Auswertung der Messdaten berücksichtigt werden.

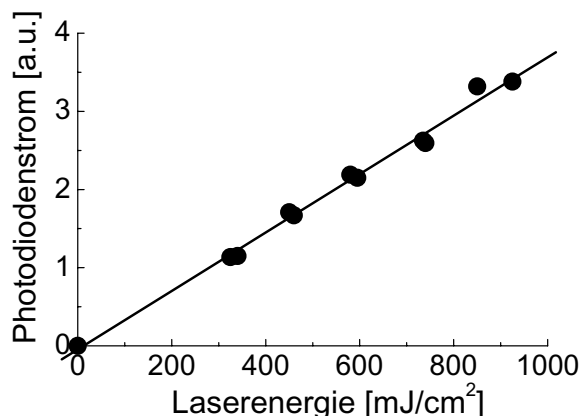


Abbildung 2.10: Beispiel einer Kalibrierungskurve der Farbstofflaserenergie

Der relative Photodiodenstrom wird in Abhängigkeit von der Laserenergie am Faserende aufgetragen und mit einer Regressionsgeraden angepasst.

Als Problem bei den Photolyseexperimenten erwies sich das Auftreten eines Laserlicht-induzierten Stromartefakts. Dieses transiente Stromsignal überlagerte den Anstieg und z.T. auch den Abfall des vorstationären  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher-Stromsignals. Die Ursache dieses Laserartefaktes ist unklar. Zum einen ist er wahrscheinlich auf Streulicht, das auf die Pipettenelektrode fällt, zurückzuführen, da eine bessere Abschirmung der Elektrode eine Verkleinerung des Artefakts zur Folge hatte. Zum anderen scheint eine Wechselwir-

kung des Laserlichts mit dem Membranpatch selbst ebenfalls zum Artefakt beizutragen: Eine vollständige Abschirmung der  $\text{Ag}^+/\text{Ag}^+\text{-Cl}^-$ -Elektrode konnte den Artefakt nicht beseitigen. Außerdem trat der Laserartefakt z.T. in Form mehrerer Schwingungen auf, die sich nicht auf ein kurzzeitiges Übersteuern des Verstärkers zurückführen ließen.

Obwohl der Laserartefakt sich nicht beseitigen lässt, kann er zumindest in der Größe minimiert werden, um so ein Übersteuern des Patch-Clamp-Verstärkers zu vermeiden. Hierzu wird kurz vor dem Auslösen des Laserpulses der „forced reset“ des Verstärkers geschaltet. Dadurch wird im kapazitiven Modus des Vorverstärkers der Rückkopplungskondensator entladen. Während dieser Zeitspanne von  $50\ \mu\text{s}$  ist der Vorverstärker unempfindlich gegenüber Eingangssignalen. Durch Aktivieren des „forced reset“  $25\ \mu\text{s}$  vor dem Auslösen des Laserpulses, werden so z.B. die ersten  $25\ \mu\text{s}$  des Signals nach der Photolyse vom Verstärker über eine „sample and hold“-Schaltung abgedeckt. Damit verliert man zwar einen Teil der Signalinformation. Aber da der Signalanstieg meist ohnehin durch den Laserartefakt überlagert bzw. durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung limitiert ist, ist dieser Informationsverlust vertretbar. Durch das erzwungene Auslösen des Resets vor dem Laserpuls wird zudem ein automatisches Auslösen des Resets während des eigentlichen Signals vermieden.

### 2.3.5 Datenerfassung und -analyse

Zur Datenerfassung und Kontrolle der Messelektronik dient das pClamp 8.0-Softwarepaket mit der zugehörigen AD/DA-Wandlerkarte DIGIDATA 1200A der Firma Axon Instruments. Der AD/DA-Wandler bietet eine 12 Bit Auflösung bei einer maximalen Eingangsspannung von  $\pm 10\ \text{V}$ . Die maximale Abtastrate beträgt  $333.33\ \text{kHz}$ . Es können bis zu 16 Eingangssignale über einen Multiplexer aufgezeichnet werden. Bei Verwendung von zwei Signaleingängen, wie es bei den Photolysemessungen der Fall war, reduziert sich die maximale Abtastrate daher auf  $166.66\ \text{kHz}$ , entsprechend einem Sampleintervall von  $6\ \mu\text{s}$ . Die Abtastrate des AD/DA-Wandlers wurde entsprechend dem Sampling-Theorem auf ein Vielfaches der Tiefpassfilterfrequenz eingestellt.

Daneben erlaubt der DIGIDATA 1200A die Ausgabe von zwei analogen Signalen (Bereich  $\pm 10\ \text{V}$ , 12 Bit Auflösung) und vier digitalen TTL-Pulsen. Alle Ein- und Ausgänge des DIGIDATA 1200A lassen sich über das Programm Clampex 8.0 auslesen bzw. ansteuern. Einer der Signaleingänge ist mit dem Ausgang des Patch-Clamp-Verstärkers verbunden, drei weitere dienen zum Auslesen des am Patch-Clamp-Verstärker eingestellten Verstärkungsfaktors ( $0.5$  bis maximal  $500\ \text{mV/pA}$ ), der Tiefpassfilterfrequenz ( $1$  bis maximal  $100\ \text{kHz}$ ) sowie der Zellkapazität über die „Telegraph-Funktion“ des Verstärkers. Es wurde für die Messungen ein Verstärkungsfaktor gewählt, der eine optimale Ausnutzung des Eingangsbereiches des DIGIDATA erlaubt. Für Photolysemessungen wurden typischerweise  $10\ \text{kHz}$  und für Lösungswechselexperimente  $1\ \text{kHz}$  als Tiefpassfilterfrequenz ( $-3\text{dB}$ -Angaben) benutzt.

Ein Ausgang des DIGIDATA ist mit dem STIM INPUT-Eingang des Patch-Clamp-Verstärkers verbunden und erlaubt so die Kontrolle des Membranpotentials. Die „Stimulus Waveform“-Funktion der Clampex-Software ermöglicht die Erstellung von Spannungsprotokollen. Synchron zu den Spannungsprotokollen können die TTL-Ausgänge des

DIGIDATA angesteuert werden. Mit einem der TTL-Ausgänge wird der Excimer-Laser getriggert, um einen Laserpuls auszukoppeln. Da der Laserpuls oftmals zu einem Stromartefakt führt, wird mit einem zweiten TTL-Ausgang die „forced reset“-Funktion des Verstärkers ausgelöst.

Die relative Energie des Farbstofflaserpulses wird über eine Fotodiode gemessen, die über einen Strom-Spannungswandler verstärkt auf einen zweiten Eingang des DIGIDATA gegeben wird. Damit kann parallel zum Signal des Patch-Clamp-Verstärkers die Laserenergie während eines Experiments kontrolliert werden.

Mit einem weiteren TTL-Ausgang des DIGIDATA können über eine Steuerbox die Ventile zum Lösungswechsel geschaltet werden (manuelle Auswahl des zu schaltenden Ventils). Alternativ können die Ventile über die zweite „Stimulus Waveform“ der Clampex-Software gesteuert werden: Abhängig von der Spannungshöhe auf dem zweiten analogen Ausgang des DIGIDATA wird ein Ventil geschaltet (automatische Auswahl des zu schaltenden Ventils).

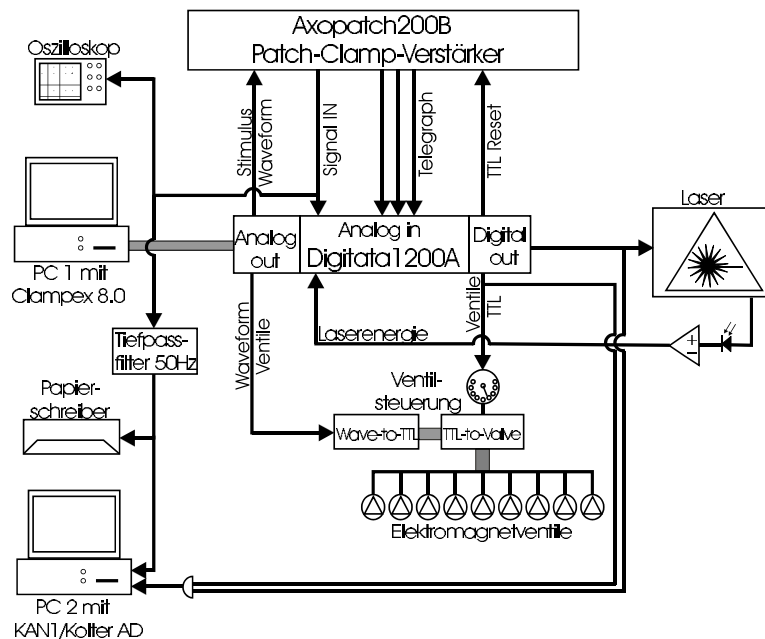


Abbildung 2.11: Blockschaltbild der Messelektronik

Neben der Aufzeichnung des Messsignal mit der Clampex-Software auf dem PC 1 kann das Messsignal auf einem Papierschreiber sowie auf einem zweiten PC mit einer Kolter AD-Wandlerkarte und der Software KAN1 aufgenommen werden. Dieser zweite PC übernimmt die Funktion eines „digitalen Kanalschreibers“ (Abtastrate 100 Hz).

Die komplette Verschaltung der Steuer- und Messelektronik ist in einem Blockschaltbild in Abbildung 2.11 dargestellt.

Bei der Aufzeichnung der Stromsignale wurde die in der Elektrophysiologie übliche Vorzeichenkonvention berücksichtigt: Ein Strom positiver Ionen über die Membran von der extrazellulären Seite (im Inside-out Patch: der Pipettenlösung zugewandten Seite) zur intrazellulären (der Badlösung zugewandten) Seite ist ein Einwärtsstrom. Dieser

Einwärtsstrom wird nach *unten* dargestellt. Entsprechend gilt bei umgekehrter Flussrichtung (Auswärtsstrom) bzw. bei einem Fluss negativer Ionen das Gegenteil. Das eingestellte Membranhaltpotential gibt immer das Potential auf der intrazellulären Seite der Membran an.

Die Auswertung der aufgezeichneten Daten erfolgte über das Programm Clampfit 8.0 des pClamp-Softwarepakets. Dieses wurde insbesondere zur Durchführung der Fits der Relaxationsmessungen verwendet. Als Fitfunktion wurde eine Summe aus Standardexponentialfunktionen verwendet:

$$f(t) = \sum_{i=1}^n A_i \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right) + C$$

Dabei wurde eine Levenberg-Marquadt-Methode mit einer Least Square-Approximation ohne Gewichtung der Daten als Fitalgorithmus benutzt. Als Konvergenzkriterium wurde eine Genauigkeit von  $10^{-6}$  verwendet:

$$\left| \sum_{n=1}^N (y_{n,m} - f_m(t, P))^2 - \sum_{y=1}^N (y_{n,m+1} - f_{m+1}(t, P))^2 \right| \leq 10^{-6}$$

( $y_n$ : Datenpunkt,  $f(t, P)$ : Fitfunktion mit Parameterset P,  $m$ : Iterationsindex)

Für die Erstellung der Abbildungen aus den gewonnenen Daten sowie für statistische Auswertungen wurde das Programm Microcal Origin 6.0 verwendet. Konzentrationsabhängigkeiten wurden mit einer Michaelis-Menten-Kinetik

$$I = I_{max} \cdot \frac{[S]}{K_M + [S]}$$

( $I$ : Strom,  $I_{max}$ : maximaler Strom bei sättigender Substratkonzentration,  $[S]$ : Substratkonzentration,  $K_M$ : Michaelis-Konstante)  
bzw. mit einer Hill-Funktion

$$I = I_{max} \cdot \frac{[S]^n}{K_{0.5}^n + [S]^n}$$

( $n$ : Hill-Koeffizient,  $K_{0.5}$ : Halbsättigungskonzentration)  
angefittet.

Simulationen zu den gewonnenen Daten wurden mit dem Programm Scientist 2.01 durchgeführt, das ein numerisches Lösen von Differentialgleichungssystemen erlaubt.

### 2.3.6 Verwendete Lösungen für die Patch-Clamp-Messungen

Nachfolgend sind die verwendeten Bad- und Pipettenlösungen aufgeführt. Zum Ansetzen der Lösungen wurde Wasser aus einer Seralpur Reinstwasseranlage verwendet, das eine spezifische Leitfähigkeit von weniger als  $0.06 \mu\text{S}/\text{cm}$  aufweist. Die Lösungen wurden steril filtriert (Filterporengröße  $0.22 \mu\text{m}$ ) und anschließend kühl gelagert.

Da die beiden untersuchten Membranproteine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig sind, spielt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Pufferung durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelatoren eine wichtige Rolle. Soweit nicht anders angegeben,

wurde für Messungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsabhängigkeit das freie  $\text{Ca}^{2+}$  durch Mischen einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator-gepufferten  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Lösung mit einer  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen, ebenfalls gepufferten Lösung eingestellt. Das Mischungsverhältnis wurde über das Programm WinMaxc berechnet.

Für die Messungen an den  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanälen wurde auf  $\text{Na}^+$  in den Lösungen verzichtet, um eine Überlagerung des Chloridstromsignals mit dem des endogenen spannungsabhängigen  $\text{Na}^+$ -Kanals in der Oozytenmembran (Baud et al., 1982, Rettinger, 1999) bei den Spannungssprungexperimenten zu vermeiden. Das  $\text{Na}^+$  wurde durch NMG (N-Methyl-D-Glucamin) ersetzt. Bei den Messungen am  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher, wo  $\text{Na}^+$  z.T. in den Lösungen notwendig war, hat dieser  $\text{Na}^+$ -Kanal aufgrund der schnellen Kinetik des  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers keine Rolle gespielt. Stattdessen mussten die Lösungen hier chloridfrei sein, da sonst der  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher-Strom vom vielfach stärkeren Signal der endogenen  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanäle überlagert worden wäre.

Das Ansetzen der DM-Nitrophen-Lösungen verdiente eine besondere Aufmerksamkeit, da die Beladung mit  $\text{Ca}^{2+}$  einen Einfluss auf die Qualität des Experiments hatte: Zum einen sollte das freie  $\text{Ca}^{2+}$  in der Lösung möglichst niedrig sein, um eine Aktivierung des Membranproteins bereits vor dem Photolyseexperiment zu vermeiden. Zum anderen sollte die Beladung mit  $\text{Ca}^{2+}$  möglichst hoch sein, um das Auftreten eines „ $\text{Ca}^{2+}$ -Spikes“ zu vermeiden (siehe auch Seite 39). Zur Kontrolle der Beladung von DM-Nitrophen mit  $\text{Ca}^{2+}$  wurde der  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive Fluoreszenzfarbstoff FLUO-3 verwendet.

Zur Kontrolle der Beladung der DMN-Lösungen mit  $\text{Ca}^{2+}$  wurden eine  $\text{Ca}^{2+}$ -freie DMN-Lösung und eine  $\text{Ca}^{2+}$ -übersättigte DMN-Lösung (mit jeweils gleicher DMN- und FLUO-3-Konzentration in Badpuffer) verwendet. Aus der  $\text{Ca}^{2+}$ -freien und der  $\text{Ca}^{2+}$ -

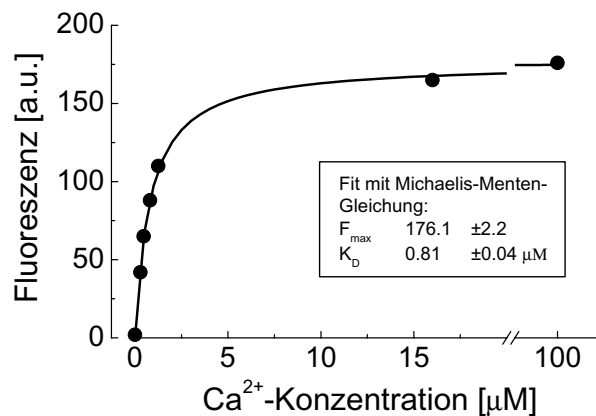


Abbildung 2.12: Fluo-3-Kalibrierungskurve

Beispiel einer Fluo-3-Kalibrierungskurve, die zur Kontrolle der Beladung einer DM-Nitrophen-Lösung erstellt wurde. Der  $K_D$ -Wert wurde durch einen Fit mit einer Michaelis-Menten-Funktion zu 800 nM bestimmt. Die Abweichung von dem vom Hersteller angegebenen  $K_D$ -Wert von 380 nM ist vermutlich auf andere Versuchsbedingungen zurückzuführen. Höhere  $K_D$ -Werte für FLUO-3-Partien des gleichen Herstellers wurden auch von anderen Gruppen gemessen (Escobar et al., 1997).

übersättigten Lösung konnte die minimale FLUO-3-Fluoreszenz  $F_{\min}$  [a.u.] und die maximale Fluoreszenz  $F_{\max}$  [a.u.] bestimmt werden, die für die Bestimmung der freien  $\text{Ca}^{2+}$ -



Konzentration in der eigentlichen DMN-Lösung über die Fluoreszenz  $F$  [a.u.] und der Formel

$$c = K_D^{Fluo3} \cdot \frac{F - F_{min}}{F_{max} - F}$$

notwendig sind. Der  $K_D$ -Wert wurde zuvor über eine Kalibrierungskurve (siehe Abbildung 2.12) für das verwendete FLUO-3-Lot ermittelt. Durch Titration konnte das freie  $Ca^{2+}$  auf die gewünschte Höhe von ca. 500 nM (für  $Na^+$ - $Ca^{2+}$ -Austauscher-Messungen) bzw. 100 nM (für CLCA-Messungen) eingestellt werden. Für jede gewünschte DMN-Konzentration musste dieses Vorgehen wiederholt werden, da DM-Nitrophen die FLUO-3-Fluoreszenz quencht (Zucker, 1992) und daher  $F_{max}$  einer niedrigen DMN-Konzentration nicht mit  $F_{max}$  einer hohen DMN-Konzentration vergleichbar ist. Dieser Quenching-Effekt beeinflusst nicht die  $Ca^{2+}$ -Affinität des Fluoreszenzfarbstoffs. Die Endkonzentration von FLUO-3 in den Lösungen lag unter 150 nM. Die durch diese niedrige Konzentration auftretenden  $Ca^{2+}$ -Puffereffekte durch das FLUO-3 beeinflussten die Konzentrations sprungexperimente daher nicht.

Der pH-Wert der Lösungen musste ebenfalls kontrolliert werden, da die  $Ca^{2+}$ -Bindung an DM-Nitrophen pH-abhängig ist. Da sämtliche Lösungen pH-gepuffert waren, ergaben sich hier in der Regel nur minimale Abweichungen. Die erfolgreiche Beladung des DM-Nitrophen zeigte sich letztendlich bei der Messung am Patch: Beim Equilibrieren einer DM-Nitrophen-Lösung mit einem  $Na^+$ - $Ca^{2+}$ -Austauscher-exprimierenden Makropatch sollte nur eine sehr schwache bzw. keine Aktivierung des  $Na^+$ - $Ca^{2+}$ -Stroms erfolgen.

## Übersicht über die verwendeten Lösungen

(alle Angaben in mM)

### *Allgemeine Oozytenlösungen*

ORI (Oozyten-Ringer-Lösung:

115 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 5 HEPES, pH-Wert 7.4 mit HCl

ORI-Pen/Stryp:

wie Lösung ORI, aber mit 9.5 mg/l Penicillin und 10 mg/l Streptomycin versetzt

Shrink-Lösung:

wie Lösung ORI, aber mit 250 mM K-MES versetzt, um einen hyperosmotischen Effekt zu erreichen

Seal-Lösung:

85 Asp, 20 TEA-Cl, 90 NMG, 0.5 EGTA, 0.5 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, pH-Wert 7.4 mit NMG

Bei den Messungen zum  $Na^+$ - $Ca^{2+}$ -Austauscher wurde das TEA-Cl auf 5 mM reduziert, um ein eventuelles Kontaminieren der Pipettenlösung mit Chlorid während der Sealbildung zu vermeiden.

### *Lösungen für Messungen an den $Ca^{2+}$ -aktivierten Chloridkanälen*

Pipettenlösung:

105 NMG, 105 HCl, 5 KCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 5 HEPES, pH-Wert 7.4 mit NMG, insgesamt 114 mM Cl<sup>-</sup>

Badlösung mit  $Ca^{2+}$  für Lösungswechsel:

105 NMG, 75 Asp, 5 TEA-Cl, 10 EDTA, 11  $Ca^{2+}$ -Gluconat, 10 HEPES, pH-Wert 7.4 mit NMG, insgesamt 5 mM Cl<sup>-</sup>

Badlösung ohne  $\text{Ca}^{2+}$  für Lösungswechsel:

105 NMG, 85 Asp, 5 TEA-Cl, 10 EDTA, 0  $\text{Ca}^{2+}$ -Gluconat, 10 HEPES, pH-Wert 7.4 mit NMG, insgesamt 5 mM  $\text{Cl}^-$

Durch Mixen der  $\text{Ca}^{2+}$ -freien mit der  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen Badlösungen wurden Lösungen verschiedener freier  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen hergestellt.

DM-Nitrophenlösungen für Photolyseexperimente:

95 NMG, 85 Asp, 5 TEA-Cl, 10 HEPES, pH-Wert 7.4 mit NMG, insgesamt 5 mM  $\text{Cl}^-$

Dieser Grundlösung wurde  $\text{Ca}^{2+}$ -Gluconat und DM-Nitrophen zutitriert, um die gewünschte DMN-Konzentration bei entsprechend eingestelltem freiem  $\text{Ca}^{2+}$  zu erlangen.

Badlösung mit hoch  $\text{Cl}^-$  für Spannungssprungexperimente:

110 NMG, 100 HCl, 15 TEA-Cl, 10 HEPES, 1 EGTA, pH-Wert 7.4 mit NMG, insgesamt 115 mM  $\text{Cl}^-$

$\text{Ca}^{2+}$ -Cyclamat wurde zutitriert, um  $\text{Ca}^{2+}$ -freie bzw.  $\text{Ca}^{2+}$ -haltige Lösungen zu erhalten.

Badlösung mit niedrig  $\text{Cl}^-$  für Spannungssprungexperimente:

95 NMG, 85 Asp, 5 TEA-Cl, 10 HEPES, 1 EGTA, pH-Wert 7.4 mit NMG, insgesamt 5 mM  $\text{Cl}^-$

$\text{Ca}^{2+}$ -Cyclamat wurde zutitriert, um  $\text{Ca}^{2+}$ -freie bzw.  $\text{Ca}^{2+}$ -haltige Lösungen zu erhalten.

Lösungen für Messungen am  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -AustauscherPipettenlösung mit hoch  $\text{Ca}^{2+}$ :

100 LiOH, 15 TEA-OH, 5 CsOH, 110 MES, 5  $\text{Ca}^{2+}$ -Cyclamat, 5 HEPES, pH-Wert 7.15 mit MES

Pipettenlösung mit niedrig  $\text{Ca}^{2+}$ :

100 LiOH, 15 TEA-OH, 5 CsOH, 110 MES, 0.1  $\text{Ca}^{2+}$ -Cyclamat, 5 HEPES, pH-Wert 7.15 mit MES

5 bzw. 10 mM  $\text{MgCl}_2$  wurden z.T. zugefügt, da die Ausbildung eines Gigaohm-seals sonst nur erschwert möglich war.

Pipettenlösung mit Strontium:

100 LiOH, 15 TEA-OH, 5 CsOH, 110 MES, 5  $\text{Sr}^{2+}$ -Acetat, 5 HEPES, pH-Wert 7.15 mit MES

Pipettenlösung mit Barium (1):

100 LiOH, 15 TEA-OH, 5 CsOH, 110 MES, 5  $\text{Ba}^{2+}$ -Acetat, 5 HEPES, pH-Wert 7.15 mit MES

Pipettenlösung mit Barium (2):

65 LiOH, 10 TEA-OH, 3 CsOH, 65 MES, 50  $\text{Ba}^{2+}$ -Acetat, 5 HEPES, pH-Wert 7.15 mit MES

Pipettenlösung mit Natrium:

100 NaOH, 15 TEA-OH, 5 CsOH, 110 MES, 1 EGTA, 5 HEPES, pH-Wert 7.15 mit MES

Badlösung mit Natrium:

100 NaOH, 15 TEA-OH, 5 CsOH, 1 EGTA, 110 MES, 5 HEPES, pH-Wert 7.15 mit MES

Badlösung mit  $\text{Ca}^{2+}$ :

100 LiOH, 15 TEA-OH, 5 CsOH, 100 MES, 5 EGTA, 6  $\text{Ca}^{2+}$ -Cyclamat, 5 HEPES, pH-Wert 7.15 mit MES

Badlösung ohne  $\text{Ca}^{2+}$ :

100 LiOH, 15 TEA-OH, 5 CsOH, 100 MES, 5 EGTA, 5 HEPES, pH-Wert 7.15 mit MES

Durch Mixen der  $\text{Ca}^{2+}$ -freien mit der  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen Badlösungen wurden Lösungen verschiedener freier  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen hergestellt.

Badlösung mit Chymotrypsin:

100 LiOH, 15 TEA-OH, 5 CsOH, 110 MES, 5 HEPES, pH-Wert 7.15 mit MES

Dieser Grundlösung wurde 1 mg/ml Chymotrypsin hinzugefügt.

DM-Nitrophen-Lösungen für Photolyseexperimente:

*100 LiOH, 15 TEA-OH, 5 CsOH, 110 MES, 5 HEPES, pH-Wert 7.15 mit MES*

Dieser Grundlösung wurden  $\text{Ca}^{2+}$ -Cyclamat und DM-Nitrophen zutitriert, um die gewünschte DMN-Konzentration bei entsprechend eingestelltem freiem  $\text{Ca}^{2+}$  zu erlangen.

## Kapitel 3

# Messungen an den $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanälen

In diesem Abschnitt werden die Messungen an den  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanälen dargestellt. Die Messungen erfolgten zum einen im Lösungswechselexperiment, bei dem der Membranpatch mit verschiedenen  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen Lösungen perfundiert wurde. Zum anderen wurden die Messungen mittels Photolyse von DM-Nitrophen durchgeführt. Die Lösungswechselexperimente wurden zum Teil mit zeitaufgelösten Spannungssprüngen kombiniert. Die Spannungssprung- und die Photolyseexperimente erlaubten im Gegensatz zum einfachen Lösungswechselexperiment die Aufzeichnung von vorstationären Strömen. Alle Messungen wurden in der *inside-out*-Patch-Konfiguration durchgeführt. Sofern nicht anders angegeben betrug die extrazelluläre (Pipetten-) Chloridkonzentration 114 mM, die intrazelluläre (Bad-) Konzentration 5 mM. Alle  $\text{Ca}^{2+}$ -Lösungen wurden mit EDTA gepuffert.

### 3.1 Stationäre Ströme im Lösungswechselexperiment

Für die Aktivierung von stationären Chloridströmen wurde der Membranpatch mit verschiedenen  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen Lösungen perfundiert. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration variierte dabei zwischen 0 mM (EDTA-gepufferte Lösung ohne nominelles  $\text{Ca}^{2+}$ ), bei der die Chloridkanäle nicht durch intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  aktiviert werden konnten, und 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  als supersättigende  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Als Filterfrequenz wurde 1 kHz, die kleinstmögliche Einstellung am Axopatch-Verstärker, verwendet und das Signal mit einer Abtastrate von 500 Hz digitalisiert, was für die Lösungswechselexperimente mehr als ausreichte.

Ein typisches Lösungswechselexperiment ist in Abb. 3.1 dargestellt. Wie in der Abbildung erkennbar ist, zeigt der Chloridstrom eine stetige Abnahme während des Versuchsverlaufs. Innerhalb von 10 Minuten ist die maximale Stromamplitude auf weniger als die Hälfte der maximalen Stromamplitude zu Versuchsbeginn abgefallen. Dieser als *Run-down* bekannte Effekt ist vermutlich auf das Auswaschen bzw. Fehlen von intrazellulären, nicht Membran-gebundenen Komponenten im *excised* Patch zurückzuführen. Durch diese stetige Signalabnahme wurde das Auswerten der Daten erschwert, da so eine nicht-sättigende  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu Versuchsbeginn eine größere Stromantwort hervorgerufen

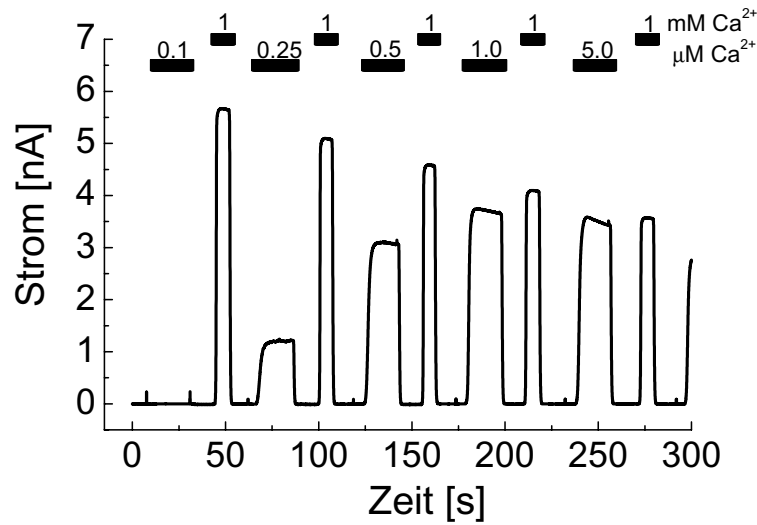


Abbildung 3.1: Beispiel eines Lösungswechselexperiments an den  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanälen

Der  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte Chloridstrom zeigt während des Versuchsverlaufs eine stetige Abnahme. Eine sättigende  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 1 mM dient zur *Rundown*-Korrektur, indem der Chloridstrom bei nicht-sättigenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen auf diese maximale Stromantwort normiert wurde.

hat, als eine sättigende  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zum Versuchsende. Daher wurde zwischen den  $\text{Ca}^{2+}$ -Testlösungen von 0.1 bis 5  $\mu\text{M}$  regelmäßig ein sättigender Puls von 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  appliziert. Der stationäre Strom der jeweiligen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wurde dann mittels dieses 1 mM- $\text{Ca}^{2+}$ -Pulses normiert, um so eine einfache Rundown-Korrektur zu erhalten.

Wie Abbildung 3.2 zeigt, löste diese Korrektur allerdings nicht alle mit dem Rundown verbundenen Probleme. Während eines Experiments kam es z.T. zu einer Verschiebung der relativen Stromantworten bezogen auf die sättigende  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration: Wie in Abbildung 3.2 ersichtlich betrug die Signalthöhe bei einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 250 nM ca. ein Viertel der maximalen Stromantwort. Während im Versuchsverlauf der Maximalstrom auf die Hälfte abgefallen war, war die Signalabnahme bei der nicht-sättigenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration weniger stark ausgeprägt: Das Stromsignal bei 250 nM  $\text{Ca}^{2+}$  erreichte nun ca. ein Drittel der maximalen Stromhöhe. Diese offenbare Verschiebung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinitäten im Versuchsverlauf führte dementsprechend zu Schwankungen bei der Bestimmung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität der  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanäle.

In Abbildung 3.7 ist die  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanäle bei 0 mV Membranpotential dargestellt. Die Konzentrationsabhängigkeit wurde sowohl mit einer Michaelis-Menten-Kinetik (Hill-Funktion mit Hill-Koeffizient  $n = 1$ ) als auch mit einer Hill-Funktion mit frei laufendem Hill-Koeffizienten gefittet: Der Fit mit der Michaelis-Menten-Kinetik ist deutlich schlechter als der Fit mit der Hill-Funktion bei frei laufendem Hill-Koeffizienten. Als Fitparameter haben sich dabei eine Halbsättigungskonzentration  $K_D = 0.50 \pm 0.02 \mu\text{M Ca}^{2+}$  und ein Hill-Koeffizient von  $n = 1.98 \pm 0.12$  ergeben (Mittelwerte aus 4 Membranpatches, Angaben jeweils  $\bar{x} \pm SD$ ). Die gefundenen Parameter für die Halbsättigungskonzentration  $K_D$  und dem Hillkoeffizienten größer eins liegen damit im

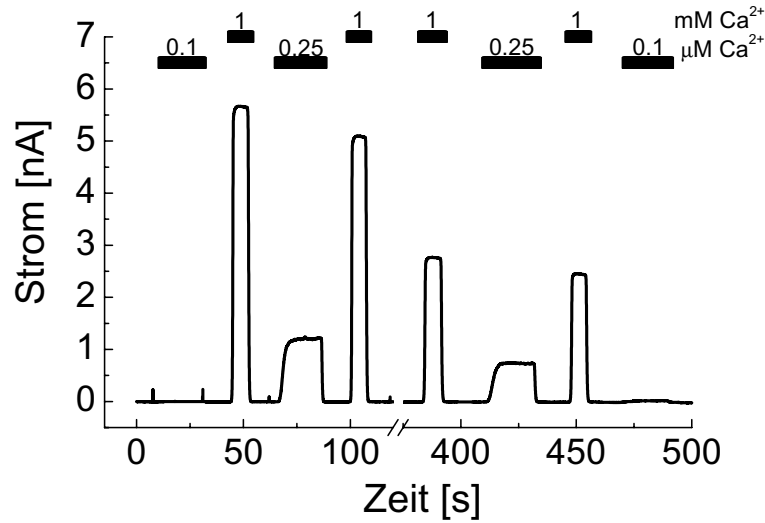


Abbildung 3.2: *Runden*-Effekt auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität der  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanäle. Das Verhältnis der Stromamplitude der Testlösung (hier  $0.25 \mu\text{M}$ ) zur Stromamplitude der maximal aktivierenden Lösung verschiebt sich z.T. während eines Experiments durch den Signal-*Runden*: bei der hier gezeigten Messung von anfangs ca.  $1/4$  auf später ca.  $1/3$ . Dadurch bedingt kommt es zu Schwankungen bei der Bestimmung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität der  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanäle.

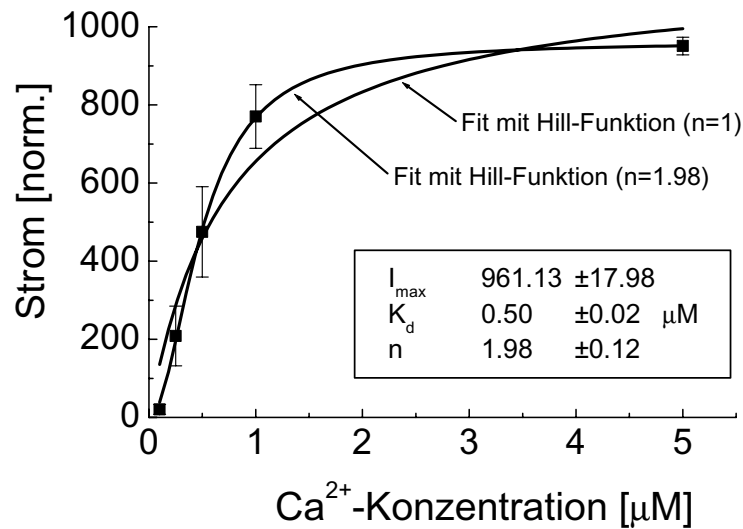


Abbildung 3.3:  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit des stationären Chlorid-Stromes. Dargestellt ist die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsabhängigkeit der  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanäle. Die Konzentrationsabhängigkeit lässt sich am besten mit einer Hill-Funktion mit einem Hill-Koeffizienten  $n$  größer eins fitten. Der Fit mit einer Michaelis-Menten-Kinetik (Hill-Funktion mit Hill-Koeffizient  $n = 1$ ) ist deutlich schlechter. Als Fitparameter ergaben sich:  $K_D = 0.50 \pm 0.02 \mu\text{M}$  und  $n = 1.98 \pm 0.12$  (Mittelwerte aus 4 Membranpatches, Angaben in  $\bar{x} \pm SE$ , die Stromamplituden wurden auf die Stromantwort sättigender  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationspulse normiert, um den Signal-Runden zu korrigieren).

Bereich der Literaturwerte für andere  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte Chloridkanäle. Der Hill-Koeffizient größer eins deutet dabei auf eine Bindung von mehr als einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion hin.

## 3.2 Vorstationäre Ströme im Photolyseexperiment

In diesem Abschnitt werden die Photolysemessungen an den  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanälen beschrieben. Für die Photolysemessungen wurde der Membranpatch mit DM-Nitrophen-Lösungen unterschiedlicher Konzentration equilibriert und anschließend ein UV-Laserpuls ( $\lambda = 308 \text{ nm}$ ) über die Quarzglasfaser in das Messvolumen eingekoppelt, um so einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung durchzuführen. Als Problem stellte sich dabei die Instabilität des Membranpatches gegenüber der Laserenergie dar, die oftmals zum Zusammenbruch des Sealwiderstandes führte. Desweiteren verursachte der Laserpuls z.T. ein Störsignal, das die ersten  $100 \mu\text{s}$  nach Auslösen des Pulses andauerte. Dieser Laserartefakt konnte durch die Reset-Funktion des Verstärkers in der Größe reduziert werden. Da die Stromsignale der  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanäle zudem recht groß (oftmals mehrere Nanoampere) waren und sich in einem langsameren Zeitbereich abspielten, störte dieser Restartefakt die Messungen nicht. Für die Aufzeichnung wurde typischerweise eine Filterfrequenz von  $5 \text{ kHz}$  und eine Samplerate von  $20 \text{ kHz}$  verwendet.

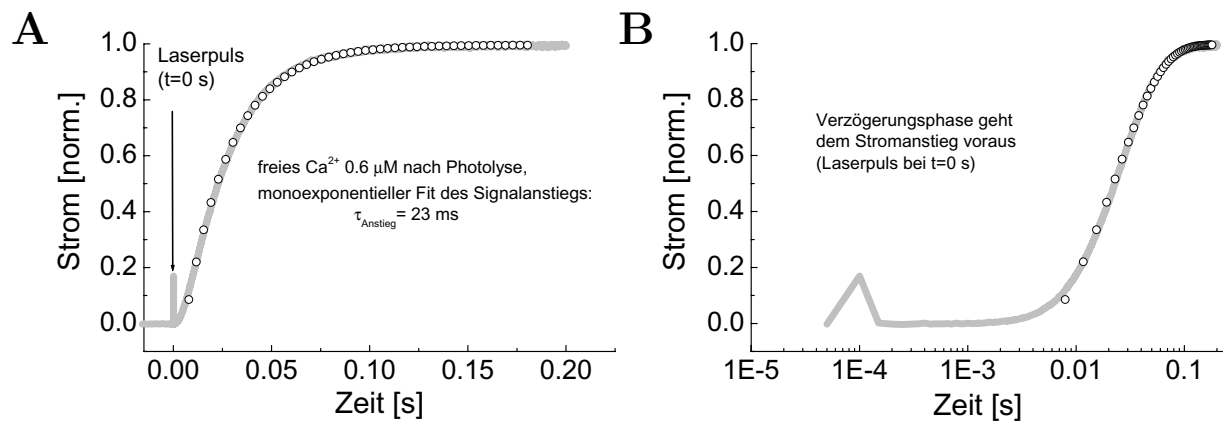


Abbildung 3.4: Beispiel eines Stromsignals nach  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung mittels Photolyse von DM-Nitrophen

A Der Signalanstieg nach einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Sprung mittels Photolyse von DM-Nitrophen (Laserpuls zum Zeitpunkt  $t = 0$ ) lässt sich mit einer monoexponentiellen Funktion mit  $\tau = 23 \text{ ms}$  fiten. Der kleine transiente Signalanteil zu Beginn ist auf den nicht vollständig durch den *forced-reset* (Dauer:  $50 \mu\text{s}$ ) abgedeckten Laserartefakt zurückzuführen.

B Halblogarithmische Darstellung des Signals aus A: Dem eigentlichen Signalanstieg geht eine Verzögerungsphase („lag phase“) voraus.

(Membranpotential  $0 \text{ mV}$ , DMN-Konzentration  $5 \mu\text{M}$ , Laserenergiedichte  $280 \text{ mJ/cm}^2$ , freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nach der Photolyse ca.  $0.6 \mu\text{M}$  (abgeschätzt über den stationären Strom))

Abbildung 3.4 zeigt ein typisches vorstationäres Stromsignal, das mit der Photolyse von DM-Nitrophen gewonnen wurde. Die freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wurde über den stationären Strom zu  $0.6 \mu\text{M}$  abgeschätzt. Der Signalanstieg lässt sich mit einer mono-

exponentiellen Funktion anpassen. Die Zeitkonstante beträgt bei dieser nicht-sättigenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration 23 ms. Wie in Abbildung 3.4B ersichtlich ist, ist der eigentliche Signalanstieg gegenüber dem Beginn des  $\text{Ca}^{2+}$ -Sprungs (Laserpuls zum Zeitpunkt  $t=0$ , erkennbar am Rest des Laserartefakts) verzögert. Diese Verzögerungsphase („lag phase“) ist deutlich schneller als der Signalanstieg. Das Auftreten einer Lagphase ist für die spätere Interpretation eines möglichen Reaktionsmodells von Bedeutung.

Als problematisch erwies sich das Auswerten dieser Lagphase, da sie sich nicht mit einer einfachen Exponentialfunktion anpassen lässt. Ein Anpassen der Lagphase mit einer Summe von Exponentialfunktionen (vgl. Fuortes und Hodgkin, 1964, Grewer, 1999) ist zwar prinzipiell möglich. Allerdings sollte dann ein kinetisches Modell (*Gating*-Modell) zugrunde liegen, in dessen Rahmen diese Vorgehensweise gerechtfertigt ist. Dies traf für die Interpretation eines Reaktionsmodells für die Chloridkanäle nicht zu (siehe spätere Diskussion), sodass auf eine quantitative Auswertung der Lagphase verzichtet wurde.

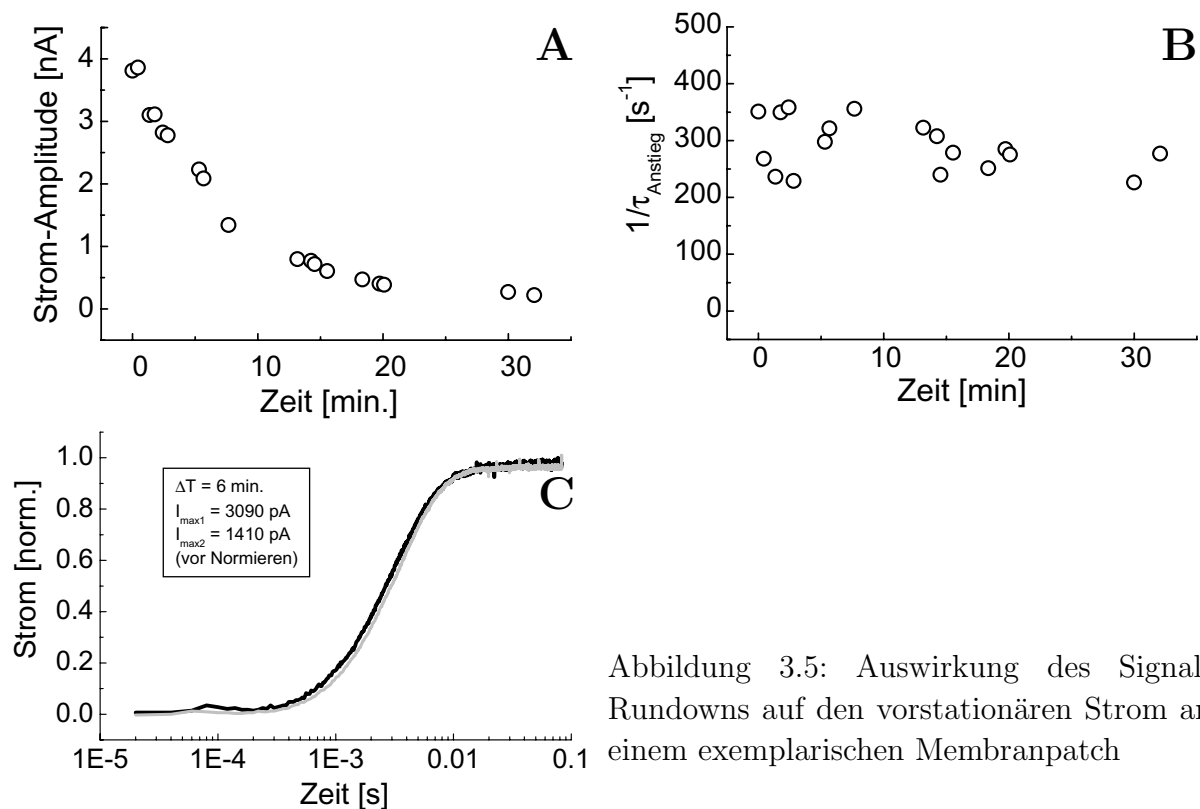


Abbildung 3.5: Auswirkung des Signal-Rundowns auf den vorstationären Strom an einem exemplarischen Membranpatch

A Rundown des Spitzenstromsignals bei sättigender  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung an einem exemplarischen Membranpatch. In weniger als 10 Minuten ist das Signal auf die Hälfte des Anfangswertes abgefallen. Der stationäre Spitzenstrom im Photolyseexperiment zeigt damit das gleiche Verhalten wie im Lösungswechselexperiment.

B Die Geschwindigkeitskonstante  $1/\tau_{\text{Anstieg}}$  des Signalanstiegs ist unabhängig vom Rundown des Spitzenstroms. Sie liegt relativ konstant bei ca.  $300 \text{ s}^{-1}$ .

C Vergleich der *Lagphase* vor (grau) und nach (schwarz) 6 Minuten Signalarundown: Während der Spitzenstrom auf die Hälfte abgefallen ist, zeigt die Lagphase keine Veränderung während des Signalarundowns. (Membranpotential 0 mV, DMN-Konzentration  $550 \mu\text{M}$ , Laserenergiedichte  $280 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ , freies  $\text{Ca}^{2+}$  nach Photolyse ca.  $70 \mu\text{M}$ )



Da sich bei den stationären Messungen im Lösungswechselexperiment ein stark ausgeprägter Rundown-Effekt zeigte, galt es zunächst zu klären, inwieweit dieser die Kinetik (das heißt, die Lag- und Anstiegsphase) beeinflusst.

Abbildung 3.5 A–C zeigt die Auswirkungen des Rundowns auf den vorstationären Strom der  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanäle am Beispiel eines exemplarischen Membranpatches. In Abb. 3.5A ist der Spitzenstrom nach einem sättigenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Sprung dargestellt: Dieser zeigt wie beim Lösungswechselexperiment eine stetige Abnahme, sodass nach 30 Minuten der Spitzenstrom auf unter ein Zehntel des Anfangswertes abgefallen ist. In Abb. 3.5B ist die Geschwindigkeitskonstante des Signalanstiegs  $1/\tau_{\text{Anstieg}}$  gegen die Zeit aufgetragen: Diese ist im Gegensatz zur Signalamplitude konstant bei ca.  $300 \text{ s}^{-1}$ . Der Rundown hat auf die Geschwindigkeitskonstante des Signalanstiegs demnach keinen Einfluss. Da die Lagphase nicht quantitativ ausgewertet werden kann, ist in Abb. 3.5C ein qualitativer Vergleich der Lagphase vor und nach einem 6-minütigen Signalarundown zu sehen. Die Stromsignale wurden beide normiert und in einer logarithmischen Zeitskala aufgetragen. Vor der Normierung betrug der Spitzenstrom nach 6 Minuten nur noch die Hälfte des Anfangswertes (1410 vs. 3090 pA). Die Lagphase ist, wie schon der Signalanstieg, nach sättigenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprüngen unbeeinflusst vom Rundown des  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridstroms.

### 3.2.1 $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit des vorstationären Chloridstroms

Nachdem im Lösungswechselexperiment die  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit bestimmt wurde, sollte auch der Einfluss der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf den vorstationären Strom untersucht werden. Hierzu musste die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration über die photolytische Freisetzung variiert werden. Dazu wurde zum einen die Laserenergie mit Graufiltern abgeschwächt. Da sich bei zu niedrigen Laserenergien und damit zu niedriger Photolyserate ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Spike ausbildet, wurden zum anderen unterschiedliche DM-Nitrophen-Konzentrationen eingesetzt. Die DMN-Konzentrationen variierten dabei zwischen 1.8 und  $550 \mu\text{M}$ . Das freie  $\text{Ca}^{2+}$  nach dem Laserpuls wurde über den Maximalstrom und dem zuvor im Lösungswechsel bestimmten  $K_D$ -Wert für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität abgeschätzt. Bei höheren, beinahe sättigenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen, wo dieses Verfahren aufgrund des Signal-Rundowns zu ungenau wäre, wurde die freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration über die eingesetzte Laserenergie und der DMN-Konzentration bestimmt. Hierzu wurde zuvor der Photolyseumsatz pro Laserenergie aus dem Maximalstrom bei subsättigenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen bestimmt. Zur Rundown-Korrektur wurde der Maximalstrom bei sättigenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprüngen herangezogen.

Abbildung 3.6A und B zeigt den vorstationären Strom bei verschiedenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden alle Signale auf den gleichen stationären Strom normiert. Dabei zeigen der Signalanstieg und die Lagphase eine deutliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit: Beide werden mit abnehmender  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration deutlich langsamer. Wie in Abbildung 3.6B ( $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der Lagphase) zu sehen ist, werden bei  $100 \text{ nM } \Delta\text{Ca}^{2+}$  nach der Photolyse 10% des Maximalstroms erst nach 200 ms erreicht. Bei einer sättigenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von  $\approx 55 \mu\text{M}$  ist dies bereits nach  $500 \mu\text{s}$  der Fall. Abbildung 3.6C zeigt den Einfluss des  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrations-Spikes durch unzureichenden

Photolyseumsatz auf den vorstationären Strom. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung wurde hier allein über die Laserenergie variiert (bei einer DMN-Konzentration von  $550\ \mu\text{M}$ ). Bei  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprüngen kleiner  $5\ \mu\text{M}$  (entsprechend einem Photolyseumsatz unter 5%) zeigt die Lagphase nur eine schwache  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit und ist schneller, vergleicht man Abbildung 3.6B und C.

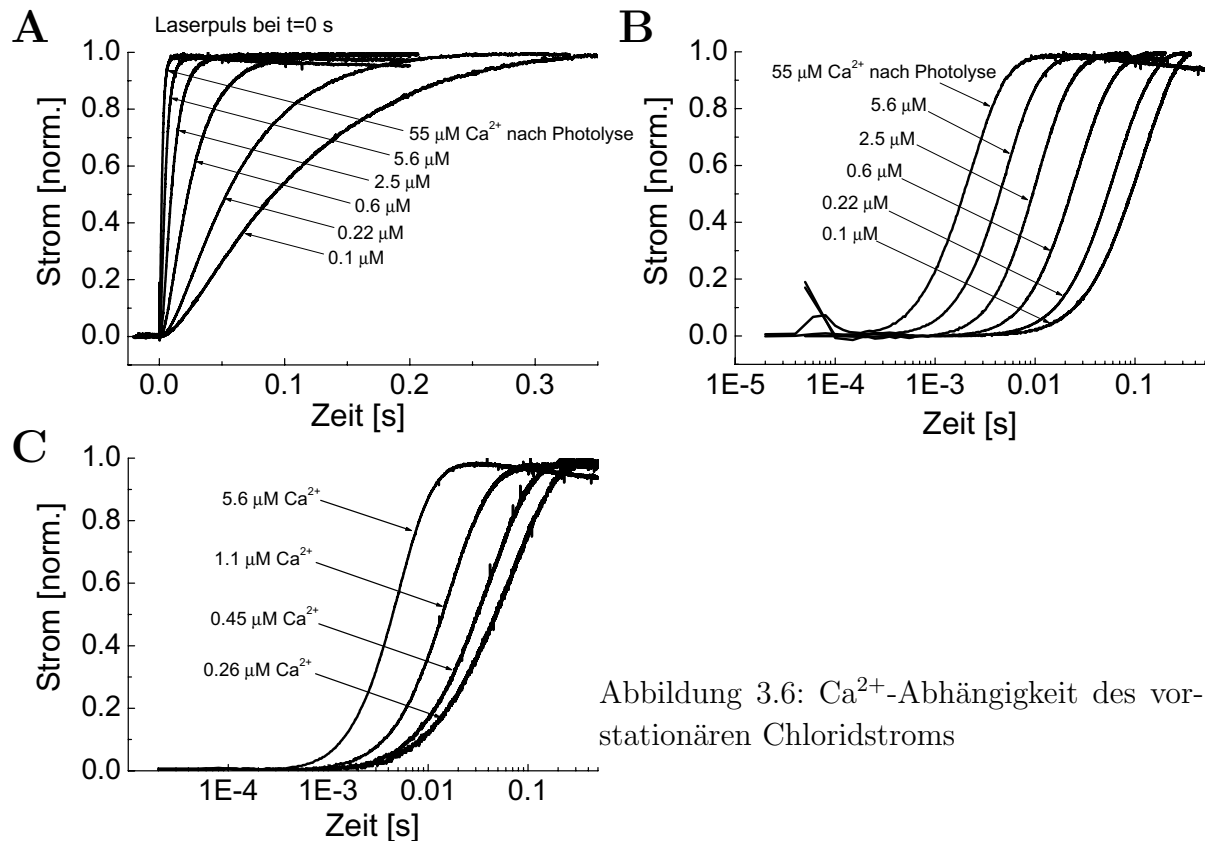


Abbildung 3.6:  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit des vorstationären Chloridstroms

A Vergleich des Signalanstiegs bei verschiedenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprüngen. Der Signalanstieg wird deutlich langsamer je niedriger die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ist.

B Halblogarithmische Darstellung der Signale aus (A). Auch die Lagphase zeigt eine starke  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit: Der Anstieg auf 10% des Maximalstroms erfolgt bei  $100\ \text{nM}$  freiem  $\text{Ca}^{2+}$  nach  $200\ \text{ms}$ , bei  $55\ \mu\text{M}$  bereits nach  $500\ \mu\text{s}$ .

(DMN-Konzentrationen:  $550\ \mu\text{M}$  (entsprechend  $\Delta\text{Ca}^{2+}$   $55$  und  $5.6\ \mu\text{M}$  nach Photolyse),  $20$ ,  $6.5$ ,  $1.8\ \mu\text{M}$  ( $\Delta\text{Ca}^{2+}$   $2.5$ ,  $0.6$ ,  $0.22$  und  $0.1\ \mu\text{M}$ ). Die Signale wurden auf den stationären Strom normiert. Signale von 5 Patches.)

C Einfluss des  $\text{Ca}^{2+}$ -Spikes auf den vorstationären Strom: Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wurde allein über die Laserenergie variiert. Die Lagphase zeigt bei Photolyseumsätzen  $<5\%$  ( $\Delta\text{Ca}^{2+} < 5\ \mu\text{M}$ ) nur eine schwache  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit im Vergleich zu B. (DMN-Konzentration  $550\ \mu\text{M}$ , Daten von einem Patch)

In Abbildung 3.7 ist die  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten des Signalanstiegs bei  $0\ \text{mV}$  Membranpotential zu sehen. Sie nimmt mit zunehmender  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu und sättigt schließlich bei hohen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit von  $1/\tau$  wurde dabei auf zwei verschiedenen Wegen angefitet: Zum einen erfolgte die Anpassung mit einer Hill-Funktion mit einem Hill-Koeffizienten  $n=2$ , zum

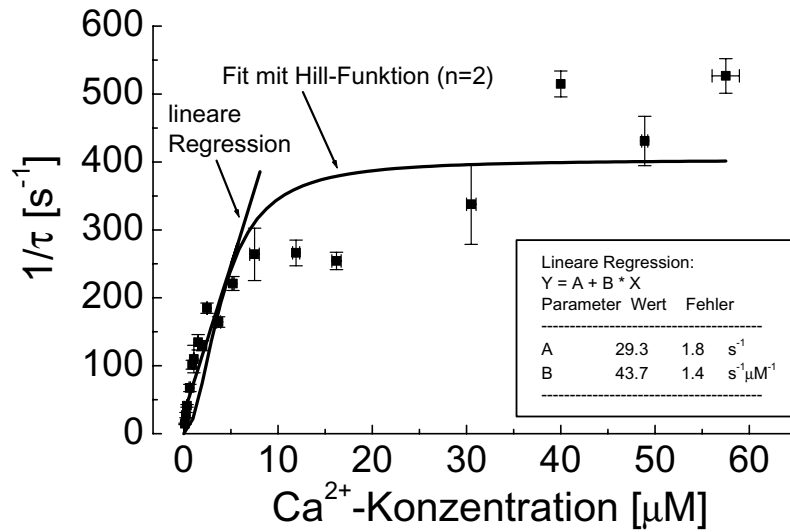


Abbildung 3.7:  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstante des Stromanstiegs

Die Geschwindigkeitskonstante wird mit zunehmender  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration größer und sättigt bei hohen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen. Ein Fit mit einer Regressionsgeraden liefert im Bereich niedriger  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen ein besseres Ergebnis als ein Fit mit einer Hill-Funktion mit einem Hill-Koeffizienten  $n=2$ . Dies erlaubt Rückschlüsse auf die Zuordnung des Signalanstiegs des vorstationären Stroms zum Kanalöffnen/-Schließen bzw. zum  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungs-/Dissoziationsschritt.

(Daten von 12 verschiedenen Membranpatches, Membranpotential 0 mV, Fehler in  $\bar{x} \pm SD$ )

anderen wurde der Signalanstieg mit einer linearen Regression ausgewertet. Der Fit mit einer Hill-Funktion mit einem Hill-Koeffizienten  $n=2$  ist insbesondere bei niedrigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen kleiner  $1 \mu\text{M}$  nicht sehr gut, während die lineare Regressionsgerade diesen Bereich besser widerspiegelt. Dieses Ergebnis wird sich ebenfalls in der späteren Diskussion als wichtig für die Aufstellung eines Reaktionsmodell herausstellen, da damit Rückschlüsse auf die Zuordnung des Signalanstiegs des vorstationären Stroms zum Kanalöffnen/-Schließen bzw. zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung/Dissoziation möglich sind.

### 3.2.2 Spannungsabhängigkeit des vorstationären Chloridstroms

Neben der  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit kann auch die Spannungsabhängigkeit des vorstationären Stroms Hinweise auf das zugrunde liegende *Gating*-Modell liefern. Als problematisch stellte sich dabei die Instabilität der Membranpatches bei der Photolyse bei von 0 mV verschiedenen Membranpotentialen heraus.

Abbildung 3.8 A und B zeigt die Spannungsabhängigkeit des Maximalstroms nach einem photolytischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Sprung an einem exemplarischem Membranpatch. Hierzu wurde der Membranpatch zu Beginn des Experiments auf das gewünschte Haltepotential geklemmt. Der Maximalstrom nach einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung per Photolyse beim jeweiligen Haltepotential wurde auf den Maximalstrom bei 0 mV zu Versuchsende normiert (Rücksprung auf 0 mV, siehe Abb. 3.8 B), um so den Signallrundown im Laufe des Experiments korrigieren zu können. Die Strom-Spannungskennlinie (Abb. 3.8 A) zeigt eine Auswärtsgleichrichtung. Allerdings tritt sie nur bei nichtsättigenden  $\text{Ca}^{2+}$ -

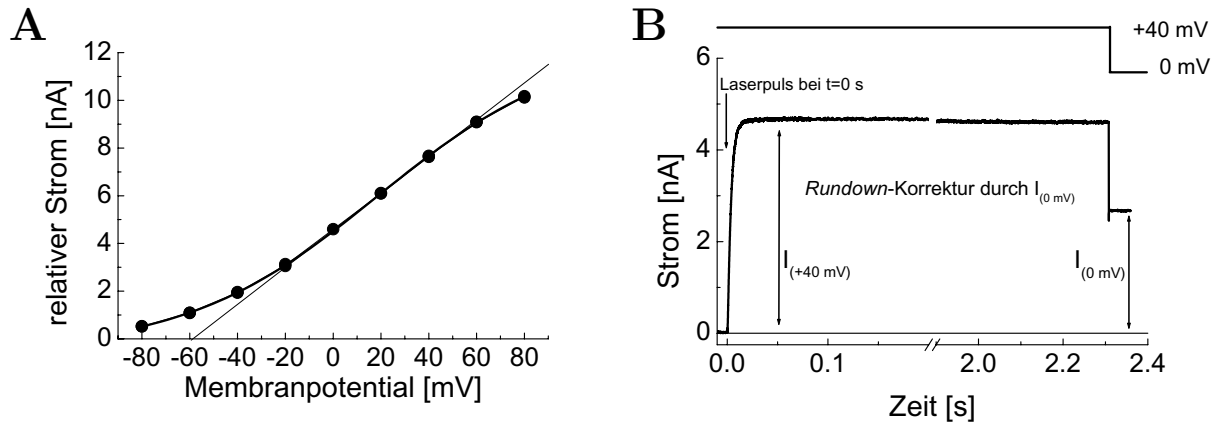


Abbildung 3.8: Spannungsabhängigkeit des Spitzenstroms bei sättigender  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung mittels Photolyse

A Spannungsabhängigkeit des Spitzenstroms an einem exemplarischen Membranpatch. Das Stromsignal zeigt eine deutliche Abweichung von einer linearen Strom-Spannungskennlinie. Bei negativem Membranpotential ist dies hauptsächlich durch den Chloridgradienten bedingt, die leichte Abweichung bei positivem Membranpotential muss dagegen andere Ursachen haben.

B Korrektur des *Rundown*-Effekts des Signals aus A. Der Wert des Stromsignals beim Rücksprung auf 0 mV (siehe angegebenes Spannungsprotokoll) wird zur Korrektur herangezogen.

(freies  $\text{Ca}^{2+}$  nach Photolyse  $\geq 20 \mu\text{M}$ , DMN-Konzentration  $550 \mu\text{M}$ , Laserenergiedichte  $90 \text{ mJ/cm}^2$ )

Konzentrationen besonders ausgeprägt auf. Da in der in Abbildung 3.8 dargestellten Messung ein sättigender  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung durchgeführt wurde, ist die Gleichrichtung bei negativem Membranpotential hauptsächlich auf den angelegten Chloridgradienten zurückzuführen. Die schwache Gleichrichtung bei positivem Membranpotential muss dagegen andere Ursachen haben. Wie später folgende Spannungssprungexperimente zeigen werden, ist dieses Verhalten vermutlich auf eine Inaktivierung des Kanals bei stark depolarisierenden Membranpotentialen zurückzuführen.

In Abbildung 3.9 A–C ist die Spannungsabhängigkeit des vorstationären Chloridstroms bei verschiedenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen zu sehen. Hierzu wurden photolytische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrations Sprünge bei Membranpotentialen von -80 bis +100 mV durchgeführt. Abbildung 3.9 A und B zeigen den Signalanstieg bei einem nichtsättigenden ( $0.2 \mu\text{M}$ ) und einem sättigenden ( $20 \mu\text{M}$ )  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung bei drei verschiedenen Membranpotentialen. Ein Inset verdeutlicht in halblogarithmischer Darstellung die Spannungsabhängigkeit der Lagphase. Wie zu erkennen ist, zeigen sowohl der Signalanstieg als auch die Lagphase keine starke Spannungsabhängigkeit. Im Vergleich zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit (s.o.) sind die Änderungen am zeitlichen Verhalten minimal. Abbildung 3.9 C verdeutlicht dies nochmals an den Geschwindigkeitskonstanten  $1/\tau_{\text{Anstieg}}$  des Signalanstiegs: Sowohl bei  $0.2$ ,  $0.6$  als auch  $20 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  ändert sich die Geschwindigkeitskonstante zwischen -80 und +80 mV um maximal 50%, während sie sich um mehr als einen Faktor 10 zwischen  $0.2$  und  $20 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  ändert.

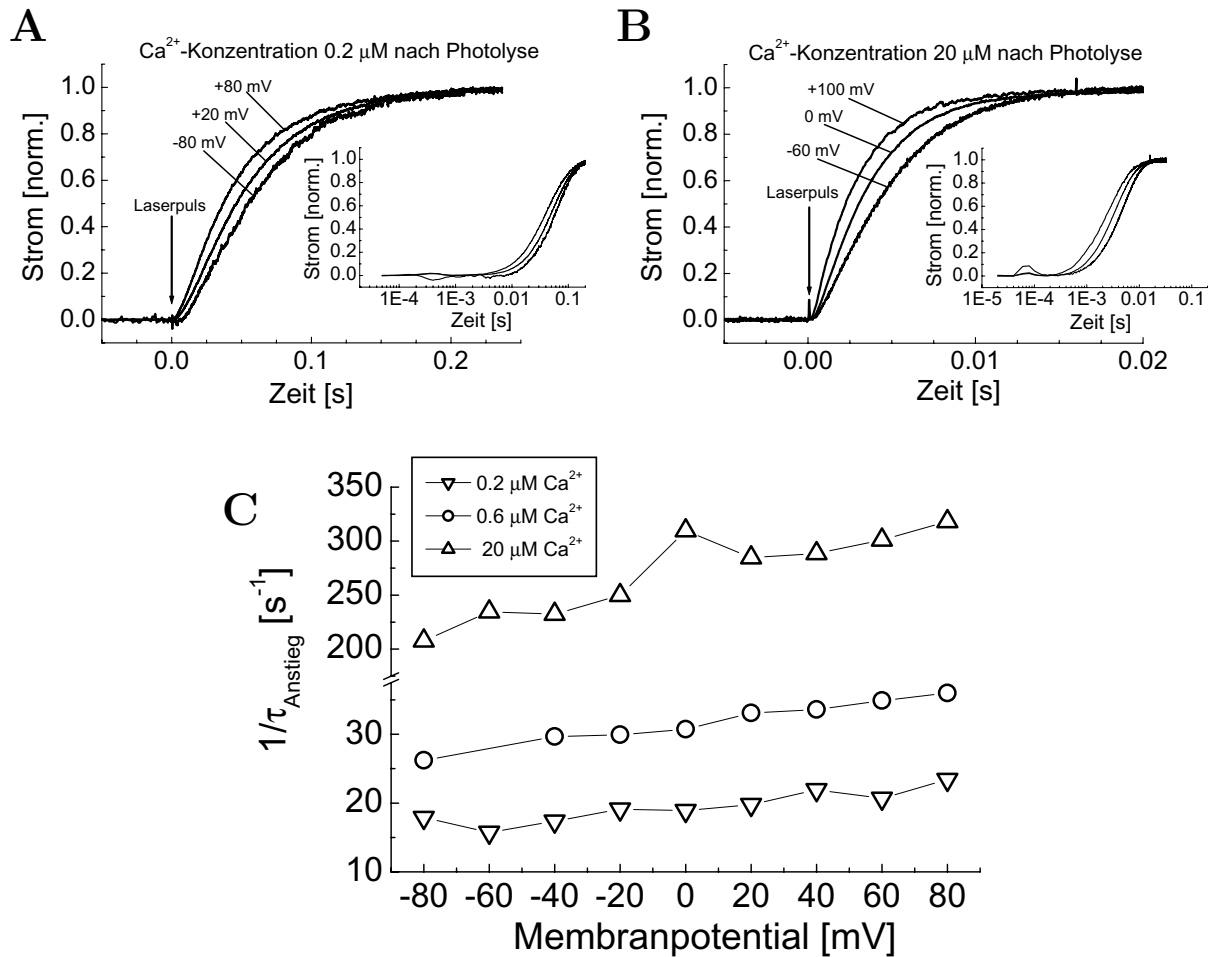


Abbildung 3.9: Spannungsabhängigkeit des vorstationären Chloridstroms

Vergleich der Spannungsabhängigkeit des  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridstroms an einem exemplarischen Membranfleckchen bei drei verschiedenen photolytischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationssprüngen:

A Nach einem nicht-sättigenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationssprung von  $0.2 \mu\text{M Ca}^{2+}$  zeigen sowohl der Signalanstieg als auch die Lagphase (siehe Inset mit halblogarithmischer Darstellung) keine ausgeprägte Spannungsabhängigkeit.

B Auch nach einem sättigenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationssprung von  $20 \mu\text{M Ca}^{2+}$  wird der Signalverlauf nur schwach vom angelegten Haltepotential beeinflusst. Im direkten Vergleich zu (A) zeigt sich dagegen die starke  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit des Signalanstiegs und der Lagphase.

C Spannungsabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstante  $1/\tau_{\text{Anstieg}}$  bei drei verschiedenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen ( $0.2$ ,  $0.6$  und  $20 \mu\text{M}$ ). Zwischen  $-80$  und  $+80 \text{ mV}$  ändert sich bei allen drei  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen die Geschwindigkeitskonstante um maximal 50%. Die Spannungsabhängigkeit ist damit im Vergleich zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit nur sehr schwach ausgeprägt.

### 3.3 Vorstationäre Ströme im Spannungssprungexperiment

Neben den  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationssprüngen mittels Photolyse von DM-Nitrophen ermöglichen auch zeitaufgelöste Spannungssprungexperimente die Registrierung von vorstationären Strömen. Spannungssprungexperimente an den  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanälen wurden in der Literatur bereits häufig beschrieben, allerdings nicht mit sehr hoher Zeitauflösung, da sich relevante Ereignisse bereits bei niedriger Zeitauflösung zeigten. Wie sich zeigen wird, lassen sich aber bei Spannungssprungexperimenten mit hoher Zeitauflösung dennoch neue Erkenntnisse gewinnen.

Bei den Spannungssprungexperimenten wurde zunächst ein hyperpolarisierendes Membranpotential von -100 mV an die Membran angelegt. Von diesem ausgehend wurden depolarisierende Potentialsprünge zwischen +100 und -75 mV mit anschließendem Rücksprung auf 0 mV durchgeführt. Dazu wurde mit der Clampex-Software ein spezielles Messprotokoll erstellt, mit dem dieser Vorgang automatisiert werden konnte. Das Messprotokoll wurde dann zum einen in der Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$  in der Badlösung, zum anderen in einer  $\text{Ca}^{2+}$ -freien, EGTA-gepufferten Badlösung durchgeföhren. Dieser Vorgang wurde mehrmals wiederholt, um sicherzustellen, dass das Gigaohmseal während des Messvorgangs stabil blieb. Insbesondere länger andauernde Potentialsprünge können zu einer drastischen Verschlechterung des Abdichtwiderstands führen. Zur Auswertung wurde dann das Differenzsignal aus dem Signal in der Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$  in der Badlösung und dem Signal in der  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Badlösung herangezogen.

Abbildung 3.10 A–D zeigt solch ein Spannungssprungexperiment in der Gegenwart von 0.3  $\mu\text{M}$  freiem  $\text{Ca}^{2+}$  in der Badlösung. Das in (A) gezeigte Signal ist bereits das Differenzsignal der in (B) gezeigten Spannungssprungsignale in der Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$  bzw. in  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Badlösung. Der  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte Chloridkanal der *Xenopus* Oozyte zeigt das typische aus der Literatur bekannte Verhalten: Nach einem depolarisierenden Spannungssprung kommt es zu einem langsamen Aktivieren des Chloridstroms, das mehrere hundert Millisekunden andauern kann. In Abbildung 3.10C ist die Strom-Spannungskennlinie nach Einschwingen auf den stationären Chloridstrom dargestellt. Bei positiven Membranpotentialen verläuft die Kennlinie linear, bei negativen Membranpotentialen zeigt sich eine Gleichrichtung. Eine Auswärtsgleichrichtung, die besonders bei subsättigenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen ausgeprägt ist, ist typisch für die  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanäle. In diesem Fall ist sie aber auch auf den angelegten Chloridgradienten (114  $\text{Cl}^-$  in der Pipette, 5  $\text{Cl}^-$  in der Badlösung) zurückzuführen. Abbildung 3.10D zeigt schließlich die Spannungsabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten  $1/\tau_{\text{Aktivierung}}$  der langsamen Aktivierung nach dem depolarisierenden Spannungssprung. Sie ist nahezu spannungsunabhängig und liegt mit  $9 \text{ s}^{-1}$  in der gleichen Größenordnung wie die Geschwindigkeitskonstante des Signalanstiegs nach einem photolytischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Sprung. Dies legt den Schluss nahe, dass es sich beidesmal um den gleichen kinetischen Schritt handelt, der durch diese vorstationären Stromsignale indirekt beobachtet wird.

In Abbildung 3.11A–D ist dasselbe Experiment wie in Abbildung 3.10 dargestellt. Diesmal wurden die Spannungssprünge allerdings in der Gegenwart einer supersättigen-

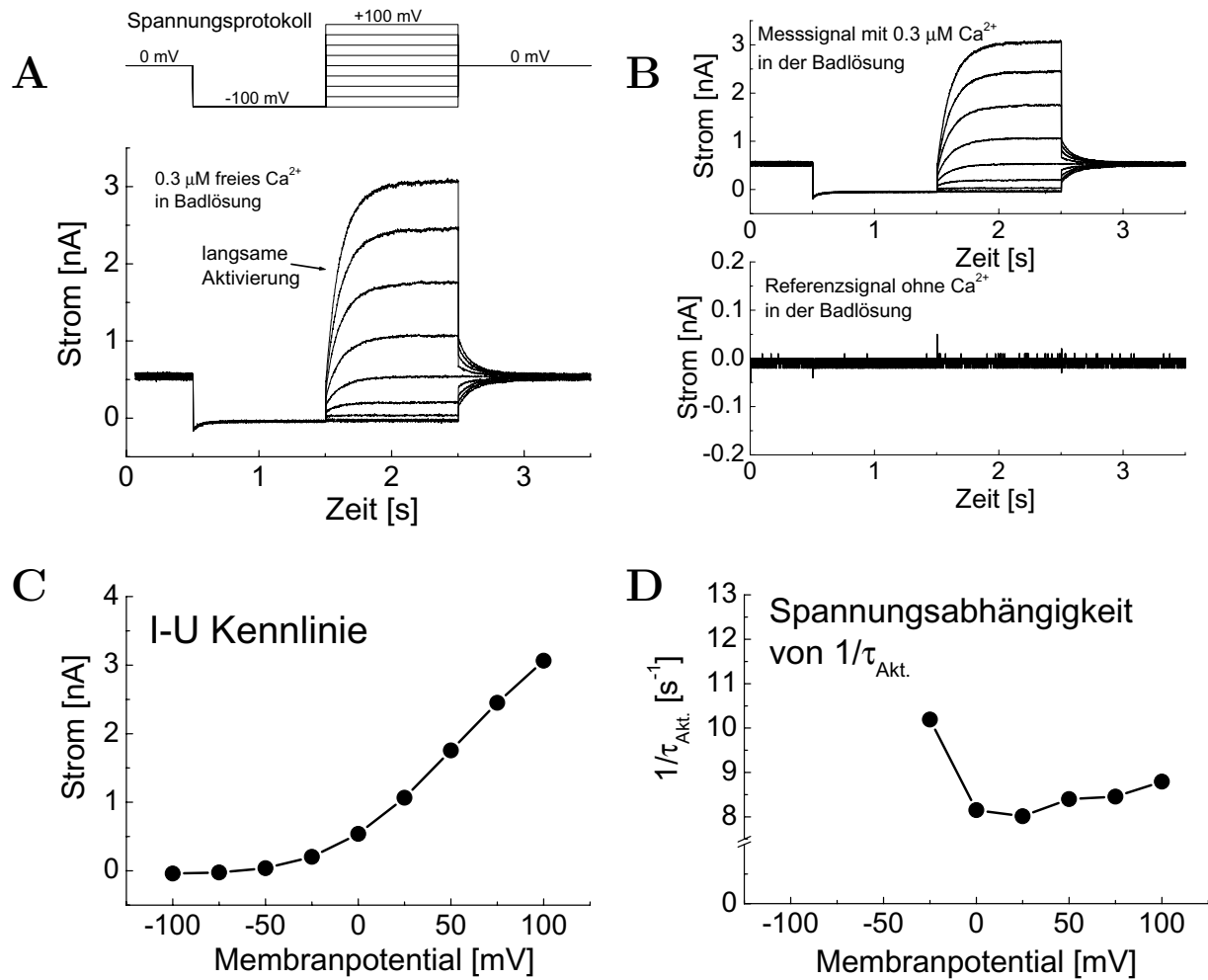


Abbildung 3.10: Spannungssprungexperiment bei nicht-sättigender  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration

A Vorstationäres Stromsignal in der Gegenwart von  $0.3 \mu\text{M}$  freiem  $\text{Ca}^{2+}$  in der Badlösung. Die Stromantwort bei  $0 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  wurde bereits vom Signal subtrahiert. Nach einem hyperpolarisierenden Spannungssprung auf  $-100 \text{ mV}$  erfolgen Sprünge auf depolarisierende Membranpotentiale von  $+100$  bis  $-75 \text{ mV}$  (siehe angegebenes Spannungsprotokoll). Der endogene  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte Chloridkanal der *Xenopus*-Oozyte zeigt die typische langsame Aktivierung.

B Stromsignale vor der Differenzbildung: Ohne  $\text{Ca}^{2+}$  in der Badlösung ist kein Chloridstrom zu verzeichnen (unten). Der Leckstrom liegt im Bereich  $\ll 100 \text{ pA}$ . Kapazitive Transienten wurden zuvor am Verstärker ausgeglichen. Das Differenzsignal aus (A) entspricht in diesem Fall im wesentlichen dem Originalsignal im oberen Bildteil.

C Strom-Spannungskennlinie des stationären Chloridstrom nach dem depolarisierenden Spannungssprung. In der Gegenwart von subsättigenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen zeigen die Chloridkanäle die typische Auswärtsgerichtung, die in diesem Fall nicht alleine durch den Chloridgradienten begründet ist.

D Geschwindigkeitskonstante  $1/\tau_{\text{Akt.}}$  des langsamen Aktivierens nach dem depolarisierenden Spannungssprungs. Sie ist wie die Geschwindigkeitskonstante  $1/\tau_{\text{Anstieg}}$  des Signalanstiegs nach einem photolytischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Sprungs praktisch spannungsunabhängig und liegt auch in der gleichen Größenordnung. Daher liegt es nahe, das beide Geschwindigkeitskonstanten den gleichen kinetischen Schritt beschreiben.

(extrazellulär  $114 \text{ Cl}^-$ , intrazellulär  $5 \text{ Cl}^-$ , Filterfrequenz  $1 \text{ kHz}$ , Samplefrequenz  $1 \text{ kHz}$ )

den  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 1 mM durchgeführt. Im Gegensatz zum Experiment mit niedrig  $\text{Ca}^{2+}$  in der Badlösung zeigt die Stromantwort auf die Spannungspulse keinen langsamen Einschwingvorgang. Bei hoher Zeitauflösung sieht man aber einen sehr schnellen Inaktivierungsprozess. Hierzu wurde das in (A) gezeigte Signal mit 10 kHz gefiltert und mit 50 kHz digitalisiert. Zeichnet man das Stromsignal bei niedrig  $\text{Ca}^{2+}$  in der Badlösung mit einer ebenfalls hohen Zeitauflösung auf, sieht man (Abb. 3.11B), dass der langsamen Aktivierung aus Abbildung 3.10 eine schnelle Inaktivierung vorausgeht. Diese ist allerdings wesentlich kleiner als bei hoher  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der Badlösung und wird durch die langsame Aktivierung deutlich überlagert. In Abbildung 3.11C ist die Strom-Spannungskennlinie zum einen des Spitzenstroms vor der Inaktivierung, zum anderen des stationären Stroms nach der schnellen Inaktivierung dargestellt. Sie zeigt beidesmal bei negativen Membranpotentialen eine leichte Gleichrichtung. Diese Gleichrichtung ist aufgrund der hohen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration schwächer ausgeprägt als in Abbildung 3.10C und hauptsächlich durch den Chloridgradienten bedingt. Bei positiven Membranpotentialen verläuft die Kennlinie des Spitzenstroms linear, während die Kennlinie des stationären Stroms die Inaktivierung in Form einer Einwärtsgleichrichtung widerspiegelt. Die Spannungsabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten  $1/\tau_{\text{Inakt.}}$  der schnellen Inaktivierung ist in (D) dargestellt. Auch sie scheint spannungsunabhängig zu sein, ist mit  $2000\text{--}3000\text{ s}^{-1}$  aber deutlich schneller als die Geschwindigkeitskonstante der langsamen Aktivierung bei niedrig  $\text{Ca}^{2+}$  oder des Signalanstiegs nach photolytischem  $\text{Ca}^{2+}$ -Sprung. Ihr liegt daher vermutlich ein bisher nicht beobachteter kinetischer Prozess zugrunde.

Um auszuschließen, dass diese schnelle Inaktivierung auf eine unzureichende Spannungsklemme des Verstärkers durch die sehr hohen Chloridströme von mehreren Nanoampere zurückzuführen ist, wurden weitere Messungen in der Gegenwart von 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  in der Badlösung bei symmetrischen Chloridkonzentrationen durchgeführt. Das Spannungsprotokoll wurde zudem abgewandelt, indem zusätzlich sowohl depolarisierende als auch hyperpolarisierende Spannungssprünge ausgehend von 0 mV Haltepotential appliziert wurden.

Eine solche Messung zeigt Abbildung 3.12A-C. Wie in (A) zu erkennen ist, zeigt sich die schnelle Inaktivierung nur bei depolarisierenden Spannungssprüngen. Da sowohl bei depolarisierenden als auch bei hyperpolarisierenden Spannungen Ströme von größer 15 nA fließen, die schnelle Inaktivierung aber nur bei depolarisierenden Haltepotentialen zu sehen ist, scheidet eine schlechte Spannungsklemme als Ursache aus. Es handelt sich daher wahrscheinlich um einen intrinsischen Effekt der  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanäle. Die Strom-Spannungskennlinie in Abbildung 3.12B zeigt dementsprechend auch wieder die Einwärtsgleichrichtung des stationären Stroms bei depolarisierenden Membranpotentialen, während die Kennlinie des Spitzenstroms vor der Inaktivierung ohmsches Verhalten zeigt: Sie verläuft im gesamten Spannungsbereich aufgrund des fehlenden Chloridgradienten und der hohen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration linear. Die Geschwindigkeitskonstante der schnellen Inaktivierung in Abbildung 3.12C ist analog zu Abbildung 3.11D nur sehr schwach spannungsabhängig und liegt mit  $2000\text{--}3000\text{ s}^{-1}$  im selben Bereich.



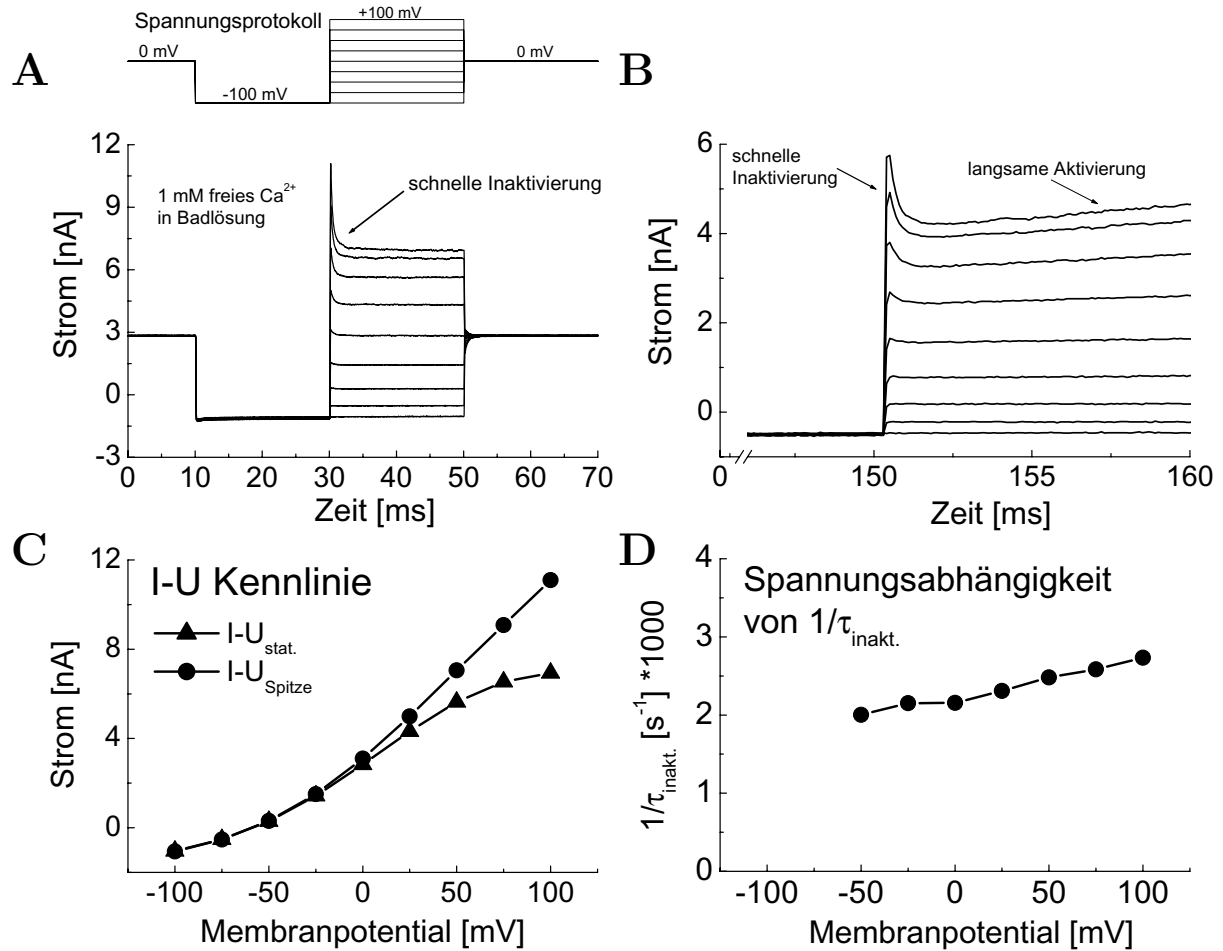


Abbildung 3.11: Spannungssprungexperiment bei sättigender  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration

A Vorstationäres Differenz-Stromsignal in der Gegenwart von 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  in der Badlösung nach depolarisierenden Spannungssprüngen (Spannungsprotokoll siehe in Abbildung). Es zeigt sich eine sehr schnelle Inaktivierungskinetik, die nur bei sehr hoher Zeitauflösung (Filterfrequenz 10 kHz, Samplerate 50 kHz) zu sehen ist.

B Differenz-Stromsignal bei 0.3  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  in der Badlösung in hoher Zeitauflösung (Filterfrequenz 5 kHz, Samplefrequenz 10 kHz): Der langsamen Aktivierung geht eine schnelle Inaktivierung voraus, die allerdings wesentlich schwächer ausgeprägt ist als bei sättigender  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der Badlösung.

C Strom-Spannungskennlinien nach dem depolarisierenden Spannungspuls. Wird die U-I-Kennlinie des Spitzenstroms (vor der Inaktivierung) aufgezeichnet, so zeigt sich nur eine leichte Auswärtsgleichrichtung bei negativem Membranpotential. Diese ist aufgrund der hohen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration weniger stark ausgeprägt und daher hauptsächlich auf den Chloridgradienten zurückzuführen. Wird die U-I-Kennlinie dagegen im stationären Bereich nach der schnellen Inaktivierung aufgezeichnet, zeigt sich neben der leichten Auswärtsgleichrichtung bei negativem Membranpotential eine Einwärtsgleichrichtung bei positivem Membranpotential, die die Inaktivierung widerspiegelt.

D Die Geschwindigkeitskonstante  $1/\tau_{\text{Inakt.}}$  der schnellen Inaktivierung nach dem depolarisierenden Spannungssprung ist mit 2000-3000  $\text{s}^{-1}$  deutlich schneller als die langsame Aktivierung bei niedrig  $[\text{Ca}^{2+}]$  in der Badlösung. Da die Inaktivierung nur bei stark sättigenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen besonders ausgeprägt beobachtet werden kann, spiegelt die Geschwindigkeitskonstante wahrscheinlich einen bisher unbekannten Reaktionsschritt wider.

(extrazellulär 114  $\text{Cl}^-$ , intrazellulär 5  $\text{Cl}^-$ , Filterfrequenz 10 kHz, Samplefrequenz 50 kHz)

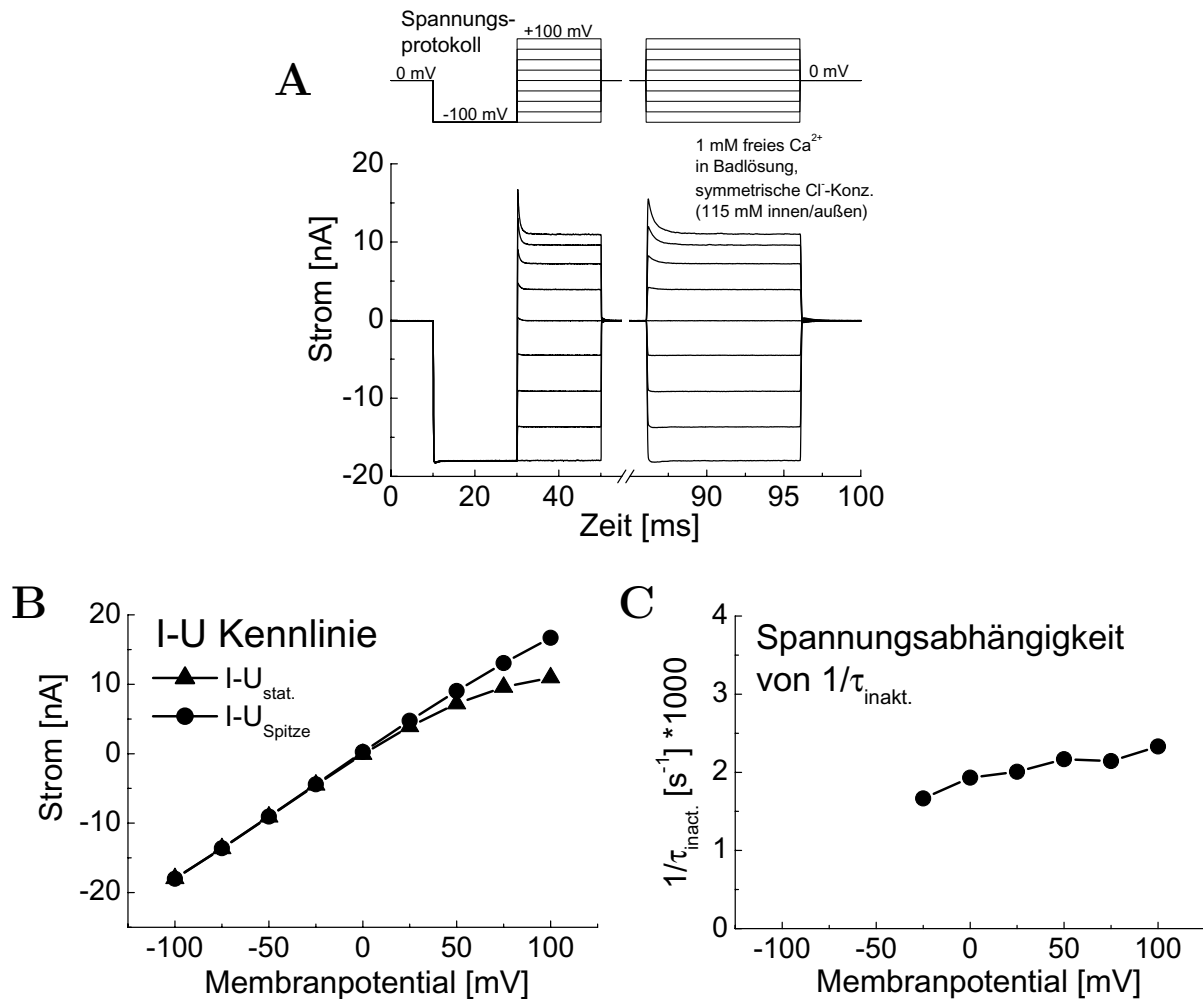


Abbildung 3.12: Spannungssprungexperiment bei symmetrischen Chloridkonzentrationen und sättigender  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration

A Vorstationäres Differenz-Stromsignal nach depolarisierenden Spannungssprüngen bei 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  in der Badlösung und symmetrischem Chloridgradienten: Da bei symmetrischem Chloridkonzentrationen sowohl bei positivem als auch bei negativem Membranpotential sehr hohe Ströme im Nanoamperebereich fließen, die Inaktivierung aber nur bei positivem Membranpotential beobachtet wird, kann ausgeschlossen werden, dass die Inaktivierung auf eine mangelhafte Spannungsklemme des Verstärkers zurückzuführen ist.

B Strom-Spannungskennlinie des Spitzenstroms und des stationären Stroms: Bei fehlendem Chloridgradienten zeigt sich keine Auswärtsgleichrichtung bei hyperpolarisierenden Membranpotentialen. Die U-I-Kennlinie des Spitzenstroms verläuft praktisch linear (ohmsches Verhalten), die des stationären Stroms zeigt, bedingt durch die Inaktivierung, eine Einwärtsgleichrichtung.

C Die Geschwindigkeitskonstante  $1/\tau_{\text{Inakt.}}$  bei fehlendem Chloridgradienten ist identisch zu der bei hohem Chloridgradienten (s.o.): Sie ist praktisch spannungsunabhängig und liegt bei  $2000\text{--}3000 \text{ s}^{-1}$ .

(extrazellulär 114  $\text{Cl}^-$ , intrazellulär 114  $\text{Cl}^-$ , Filterfrequenz 10 kHz, Samplefrequenz 50 kHz)

## Kapitel 4

# Messungen am heterolog exprimierten $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ -Austauscher

### 4.1 Einführende Messungen am heterolog exprimierten $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ -Austauscher

Zur Überprüfung der Expression des geklonten Meerschweinchen- $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ -Austauschers NCX1 wurden einige einführende Messungen im Lösungswechsel- und Photolyseexperiment durchgeführt, um so einen Vergleich mit früheren Messungen am nativen Austauscherprotein zu haben. Insbesondere galt es hierbei zu überprüfen, ob die vorstationären Stromsignale das gleiche kinetische Verhalten aufweisen.

In Abbildung 4.1 ist ein typisches Lösungswechselexperiment dargestellt, wie es zur

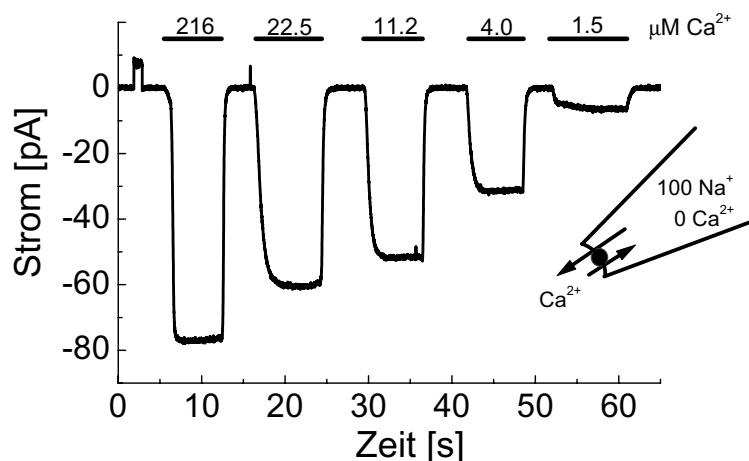


Abbildung 4.1: Beispiel eines Lösungswechselexperiments am heterolog exprimierten  $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ -Austauscher

Intrazellulär wurden verschiedene  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen bei 0 mV Membranpotential appliziert. Die Pipettenlösung (extrazelluläre Membranseite) enthielt 100 mM  $\text{Na}^+$  und kein  $\text{Ca}^{2+}$ . Der Patch wurde zuvor eine Minute lang mit  $\alpha$ -Chymotrypsin (1 mg/ml) behandelt. Es zeigte sich ein  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Einwärtsstrom, wie er im einwärtsgerichteten  $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ -Austausch-Transportmodus zu erwarten war.

Bestimmung des intrazellulären  $K_M$ -Wertes für  $\text{Ca}^{2+}$  durchgeführt wurde. Die Pipettenlösung enthielt 100 mM  $\text{Na}^+$ .  $\text{Ca}^{2+}$ -Verunreinigungen in den Salzen wurden mit EGTA gebunden. Auf der intrazellulären Membranseite wurden verschiedene  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen appliziert. Zuvor wurde der Membranfleck zur Deregulation des Austauschers für eine Minute mit  $\alpha$ -Chymotrypsin (1 mg/ml) behandelt. Wie in der Abbildung ersichtlich ist, zeigte sich ein  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Einwärtsstrom, wie er für einen einwärtsgerichteten  $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ -Austausch zu erwarten war.

Auch die Behandlung des Proteins mit  $\alpha$ -Chymotrypsin führte beim heterolog exprimierten Austauscher zu der vom nativen Protein bekannten Deregulation (Hilgemann et al., 1992), wie in Abbildung 4.2 zu sehen ist: Vor der intrazellulären Applikation von 1 mg/ml  $\alpha$ -Chymotrypsin kam es bei einem intrazellulären  $\text{Na}^+$ -Sprung ( $c_{\text{Na}^+} = 100$  mM, extrazellulär 5 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) zu der typischen Signalabnahme des Auswärtsstromsignals, die auf die  $\text{Na}^+$ -abhängige Inaktivierung des Austauschers zurückzuführen ist. Nach der  $\alpha$ -Chymotrypsinbehandlung blieb der Strom bei einem  $\text{Na}^+$ -Sprung auf einem stationären Wert und zeigte kein Inaktivierungsverhalten mehr.

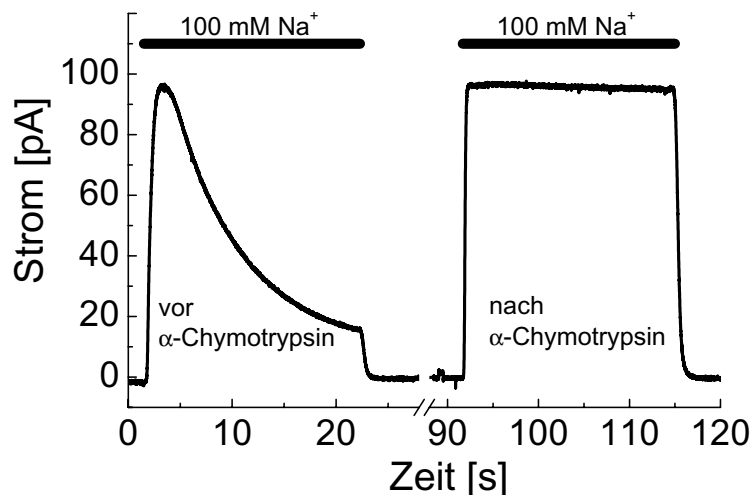


Abbildung 4.2: Deregulation des  $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ -Austauschers durch  $\alpha$ -Chymotrypsin

Bei intrazellulärer Applizierung von 100 mM  $\text{Na}^+$  (5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  extrazellulär) zeigt sich ein Auswärtsstrom, der rasch abnimmt. Nach der intrazellulären Behandlung mit  $\alpha$ -Chymotrypsin (1 mg/ml) für eine Minute ist bei erneuter Applizierung von 100 mM  $\text{Na}^+$  keine Inaktivierung mehr zu verzeichnen. Der heterolog exprimierte  $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ -Austauscher zeigt damit die typische Deregulation des Austauschers durch  $\alpha$ -Chymotrypsin.

Die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit des  $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ -Austauschers ist in Abbildung 4.3 dargestellt. Der Membranpatch wurde hierfür, wie auch für alle späteren Messungen, zuvor mit  $\alpha$ -Chymotrypsin behandelt. Die Pipettenlösung enthielt 100 mM  $\text{Na}^+$  und kein  $\text{Ca}^{2+}$ , während intrazellulär verschiedene  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen von 1.5 bis 216  $\mu\text{M}$  bei 0 mV Membranpotential über den Patch perfundiert wurden. Die Daten stammen von 10 verschiedenen Membranflecken und wurden auf den Maximalstrom bei 216  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  normiert. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsabhängigkeit lässt sich mit einer Michaelis-Menten-Funktion anpassen und ergibt einen  $K_M$ -Wert von  $7.0 \pm 0.5 \mu\text{M}$  ( $\bar{x} \pm SD$ ) für intrazelluläres

$\text{Ca}^{2+}$ . Der  $K_M$ -Wert liegt damit ein wenig höher als der von Kappl (1997) für den nativen Austauscher in Meerschweinchen-Herzzellmembranflecken bestimmten Wert von  $4.1 \mu\text{M}$ , aber unter dem an Ratten-Herzzellmembranflecken bestimmten Wert von  $9.8 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ .

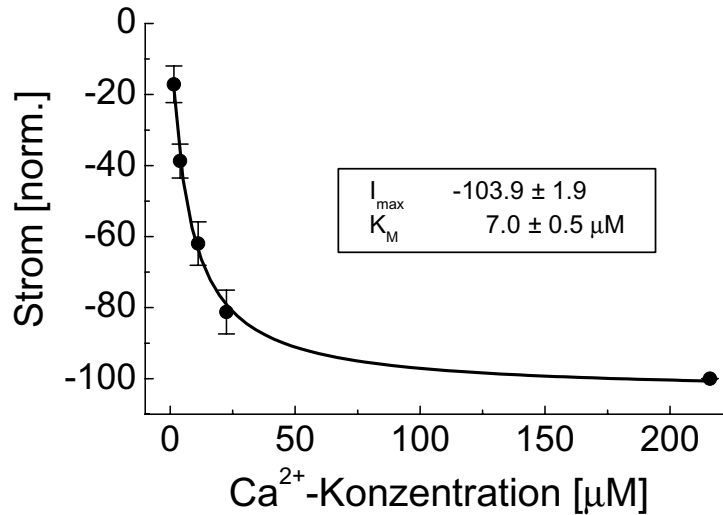


Abbildung 4.3: Intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität des  $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ -Austauschers im  $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ -Austausch-Modus

Bei Anwesenheit von  $100 \text{ mM}$   $\text{Na}^+$  auf der extrazellulären Membranseite wurde die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zwischen  $1.5$  und  $216 \mu\text{M}$  variiert. Der Patch wurde zuvor mit  $\alpha$ -Chymotrypsin behandelt. Ein Fit mit einer Michaelis-Menten-Funktion ergibt einen  $K_M$ -Wert von  $7.0 \pm 0.5 \mu\text{M}$  ( $\bar{x} \pm SD$ ).

(Membranpotential  $0 \text{ mV}$ , Daten aus 10 verschiedenen Membranflecken, Signale auf Maximalstrom bei  $216 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  normiert)

Auch die durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrations sprünge mittels Photolyse von DM-Nitrophen generierten vorstationäre Ströme zeigen beim heterolog exprimierten Austauscher das gleiche Verhalten wie beim nativen Protein (siehe Abbildung 4.4A und B): Sowohl im  $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ - als auch im  $\text{Ca}^{2+}\text{-Ca}^{2+}$ -Austauschmodus gibt es ein schnell ansteigendes transientes Einwärtsstromsignal, das dann monoexponentiell abfällt. Während sich im  $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ -Austausch nach Einstellung des Gleichgewichts ein stationärer Einwärtsstrom ergibt, ist im  $\text{Ca}^{2+}\text{-Ca}^{2+}$ -Austausch nur ein transientes Einwärtssignal zu sehen, da nach Einstellung des Gleichgewichts kein Nettoladungstransport stattfindet.

Abbildung 4.4 verdeutlicht nebenbei einen Vorteil der heterologen Expression des Austauschers: Es konnten z.T. Spitzenströme größer  $300 \text{ pA}$  erreicht werden, was bei Messungen an nativen Herzzellmembranen nicht möglich war. Allerdings hatten sich die Membranflecken mit sehr großer Expressionsdichte des Austauschers auch als sehr instabil bei den Photolysemessungen herausgestellt, sodass die Expression für diese Messungen wieder reduziert werden musste. Die durchschnittliche Signalgröße lag dennoch deutlich über der der Messungen am nativen Austauscher in Herzzellmembranen.

Um eine Wechselwirkung mit endogenen,  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Membranproteinen zu erkennen, wurden zudem Kontrollmessungen an nicht mit der Austauscher-RNA injizierten Oozyten durchgeführt. Zwei solcher Kontrollmessungen sind in Abbildung 4.5A und B dargestellt. Wie in Abb. 4.5A zu sehen ist, ergaben intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Sprünge im Lösungs-

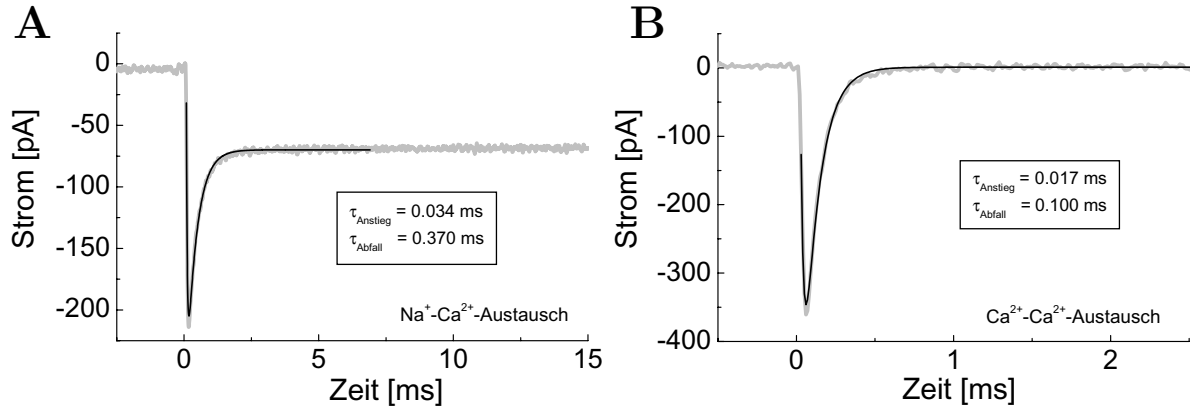


Abbildung 4.4: Vorstationäre Ströme des  $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ -Austauschers im  $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ - und  $\text{Ca}^{2+}\text{-Ca}^{2+}$ -Austauschmodus nach photolytischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprüngen

A Vorstationärer Strom bei 100 mM  $\text{Na}^+$  auf der extrazellulären Membranseite: Nach einem intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$ -Sprung auf 100  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  mittels Photolyse von DM-Nitrophen ( $c_{\text{DMN}} = 1 \text{ mM}$ , Laserenergiedichte 310  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ ) zeigt sich ein schnell ansteigender ( $\tau_{\text{Anstieg}} = 0.034 \text{ ms}$ ) Einwärtsstrom, der auf einen stationären Strom abfällt ( $\tau_{\text{Abfall}} = 0.370 \text{ ms}$ ).

B Vorstationärer Strom bei 5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  auf der extrazellulären Membranseite: Nach der partiellen Photolyse von DM-Nitrophen (Konzentration 4.8 mM, freies  $\text{Ca}^{2+}$  nach der Photolyse  $> 400 \mu\text{M}$ ) ergibt sich nur ein transienter Einwärtsstrom. (Fitparameter:  $\tau_{\text{Anstieg}} = 0.017 \text{ ms}$ ,  $\tau_{\text{Abfall}} = 0.100 \text{ ms}$ .)

Die vorstationären Ströme nach einem schnellen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung im Homo- und Heteroaustauschmodus des heterolog exprimierten Meerschweinchen- $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ -Austauschers zeigen damit die gleiche Kinetik wie das native Protein.

(Laserpuls bei  $t=0 \text{ ms}$ , Anpassungen mit einer biexponentiellen Funktion, Membranpotential 0 mV, Bandbreite des Filters: 10 kHz)

wechselexperiment (100 mM  $\text{Na}^+$  extrazellulär) nur kleine ( $\leq 1 \text{ pA}$ ) Stromantworten, die zudem im verwendeten Konzentrationsbereich keine  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit zeigten. Diese Signale sind daher möglicherweise auf die endogenen  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanäle zurückzuführen, die eine deutlich höhere  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität besitzen als der  $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ -Austauscher, und somit auch bei der kleinsten verwendeten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bereits maximal aktiviert wurden. Bei Messungen im Photolyseexperiment an Kontroll-oocytenmembranen zeigte sich außer einem kleinen Laserlichtartefakt kein transientes Stromsignal (siehe Abb. 4.5B). Damit kann auch der endogene  $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ -Austauscher in der Oocytenmembran, dessen Existenz von Schlieff und Heinemann (1995) vorgeschlagen wurde, nur eine vernachlässigbare Expressionsdichte aufweisen, da er im *excised*-Makropatch-Experiment nicht nachweisbar ist. Die Messungen am heterolog exprimierten  $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ -Austauscher sollten daher weitestgehend ungestört von endogenen  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Proteinen in der Oocytenmembran sein.

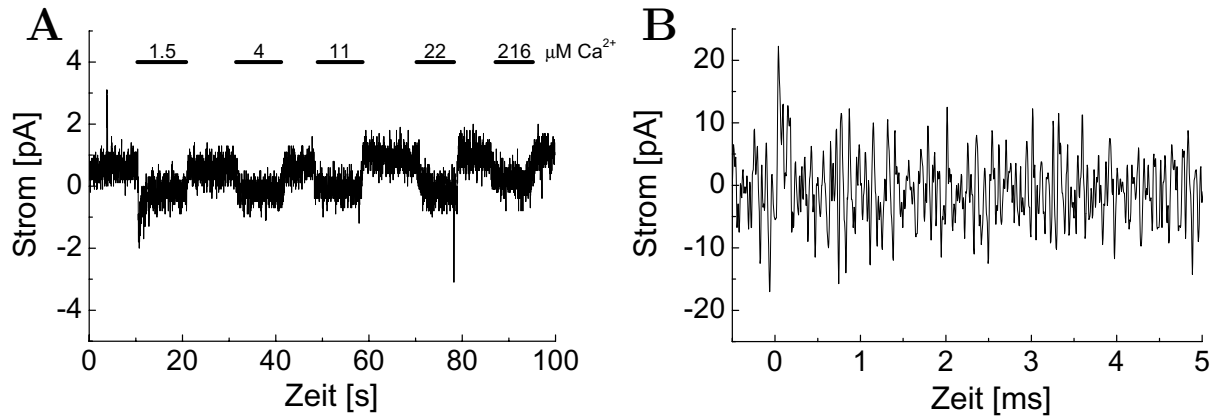


Abbildung 4.5: Kontrollmessungen an nicht-injizierten Oozyten

Zur Kontrolle auf Wechselwirkungen mit endogenen Membranproteinen wurden Lösungswechsel- und Photolyseexperimente an nicht mit der Austauscher-RNA injizierten Oozyten durchgeführt.

A Lösungswechselexperiment wie in Abbildung 4.1 (100 mM  $\text{Na}^+$  extrazellulär, intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Sprünge zwischen 1.5 und 216  $\mu\text{M}$ ): Es zeigen sich nur minimale Einwärtsströme (Größenordnung 1 pA) ohne erkennbare  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit.

B Photolyseexperiment wie in Abbildung 4.4B: Die Pipettenlösung enthielt 5 mM  $\text{Ca}^{2+}$ . Die Photolyse von 500  $\mu\text{M}$  DM-Nitrophen zum Zeitpunkt  $t=0$  ms führt zu einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung auf ca. 50  $\mu\text{M}$ . Es ist außer einem kleinen auswärtsgerichteten Laserartefakt kein transientes Stromsignal zu verzeichnen.

(Membranpotential bei beiden Messungen 0 mV, Bandbreite im Photolyseexperiment 10 kHz, im Lösungswechselexperiment 1 kHz)

## 4.2 Messungen im $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch-Modus

### 4.2.1 $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit des einwärtsgerichteten $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Transports

In diesem Abschnitt soll die  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit des einwärtsgerichteten  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Transports dargestellt werden. Bei den in diesem Abschnitt gezeigten Messungen befanden sich extrazellulär (d.h. in der Pipettenlösung) 100 mM  $\text{Na}^+$  und kein  $\text{Ca}^{2+}$  (gepuffert mit EGTA). Die intrazellulären (Bad-) Lösungen enthielten dagegen kein  $\text{Na}^+$ .  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprünge verschiedener Höhe wurden durch Photolyse verschiedener DMN-Konzentrationen (60, 100, 200, 300, 750 und 1500  $\mu\text{M}$ ) erreicht. Die Laserenergie wurde nur in geringem Maße variiert, um die Ausbildung einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationspitze bei zu niedrigem Umsatz des DM-Nitrophen zu vermeiden. Vor den eigentlichen Messungen wurde der Membranpatch für eine Minute mit  $\alpha$ -Chymotrypsin (1 mg/ml) behandelt, um den Austauscher zu deregulieren. Das Membranpotential wurde für alle Messungen auf 0 mV gehalten. Die Filterbandbreite betrug 10 kHz. Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur (22°C) durchgeführt.

Ein typisches Austauschersignal im  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Transportmodus nach verschieden hohen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprüngen ist in Abbildung 4.6 dargestellt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Signale bei  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprüngen auf ca. 6, 10, 20, 30,

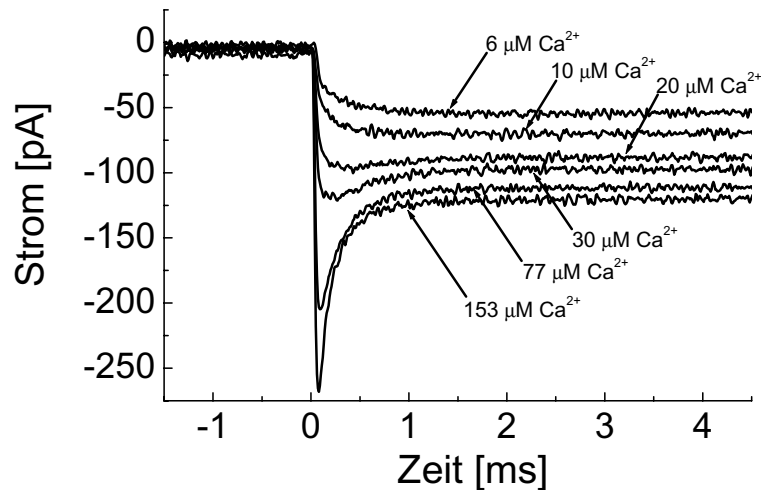


Abbildung 4.6: Vorstationäres Stromsignal des einwärtsgerichteten  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Transports bei verschiedenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationssprünge auf 6, 10, 20, 30, 77 und 153  $\mu\text{M}$  wurden durch Photolyse (Laserpuls zum Zeitpunkt  $t=0$  ms) von sechs unterschiedlich konzentrierten DM-Nitrophen-Lösungen auf der intrazellulären Membranseite hervorgerufen. Ein schnell ansteigendes transientes Einwärtsstromsignal, das dann auf einen stationären Strom abfällt, ist nur bei hohen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationssprüngen zu beobachten. Bei niedrigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationssprüngen steigt das Stromsignal biphasisch auf einen stationären Einwärtsstrom an.

Die Signale stammen alle vom selben Membranfleck und wurden zur besseren Vergleichbarkeit übereinander gelegt.

(Membranpotential 0 mV, 100 mM  $\text{Na}^+$  extrazellulär, DMN-Konzentrationen 60, 100, 200, 300, 750 und 1500  $\mu\text{M}$ )

77 und 153  $\mu\text{M}$  übereinandergelegt. Der Laserpuls zur Photolyse erfolgte jeweils zum Zeitpunkt  $t=0$  ms. Die Einzelmessungen stammen alle vom selben Membranfleck. Auffällig ist, dass der schnelle einwärtsgerichtete Signalüberschwinger nur bei den höheren  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationssprüngen auftritt. Bei niedrigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen steigt das Stromsignal dagegen biphasisch mit einer schnellen und einer langsamen Phase auf den stationären Wert an. An dieser Beispielmessung ist bereits erkennbar, dass der stationäre Strom, der Spitzenstrom, die Abklingzeit des Signalabfalls vom Spitzen- auf den stationären Strom sowie bei niedrigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen auch der Signalanstieg eine deutliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit zeigen. Eine detaillierte Auswertung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit dieser einzelnen Signalkomponenten ist in den folgenden Abbildungen dargestellt.

Abbildung 4.7 zeigt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit des stationären Stroms. Im Gegensatz zu Abbildung 4.3 wurden die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationssprünge nicht per Lösungswechsel sondern per Photolyse verschiedener DMN-Konzentrationen durchgeführt. Diese Messungen dienen hauptsächlich zur Abschätzung des Photolyseumsatzes des DM-Nitrophen. Hierzu wurde einmalig die freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nach der Photolyse der niedrigsten DMN-Konzentration (60  $\mu\text{M}$ ) bestimmt, indem die Höhe des stationären Stromsignal (bezogen auf den maximalen Strom bei sättigendem  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationssprung) eines exemplarischen Membranfleckens mit den aus den Lösungswechselexperimenten bekannten Daten



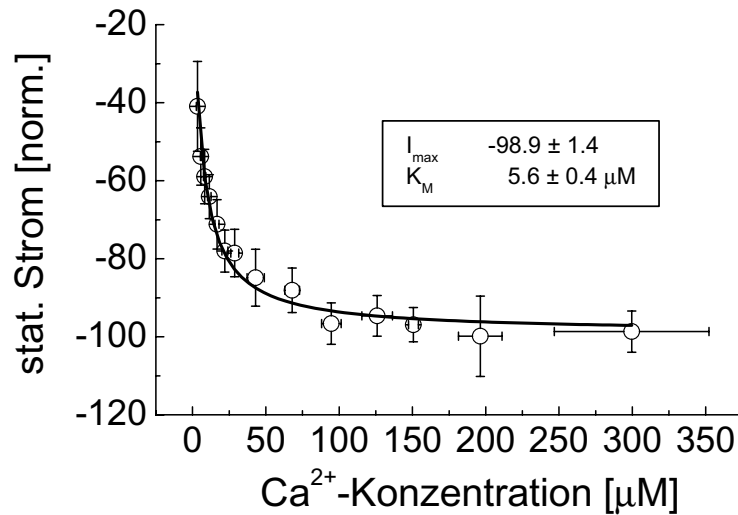
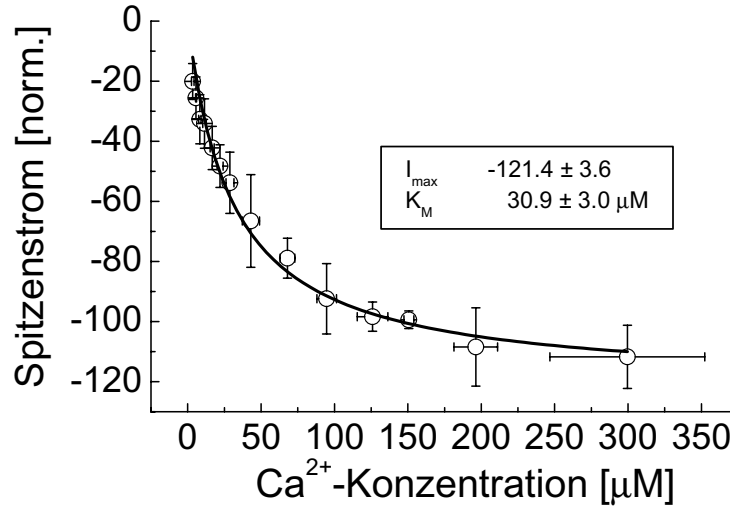


Abbildung 4.7:  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit des stationären  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Stromsignals

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit des stationären Stromsignals wurde neben den Lösungswechselexperimenten (siehe Abb. 4.3) auch aus dem stationären Strom nach einem photolytischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung auf der intrazellulären Membranseite bestimmt. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung wurde hauptsächlich über die DMN-Konzentration variiert; in geringem Maße auch über die Laserenergie. Die freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wurde aus der Freisetzungsrate pro Laserenergie, der DMN-Konzentration und der eingesetzten Laserenergiedichte abgeschätzt. Da durch die schwankende Laserenergie die freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ebenfalls variierte, wurden nahe liegenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen bei der Auswertung zusammengefasst. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit lässt sich gut mit einer Michaelis-Menten-Kinetik anpassen. Als Parameter ergaben sich für den relativen Maximalstrom  $I_{\max} = -98.9 \pm 1.4$  und für die Michaelis-Konstante  $K_M = 5.6 \pm 0.4 \mu\text{M}$ . Der  $K_M$ -Wert liegt damit relativ nahe zu dem aus dem Lösungswechselexperiment bestimmten Wert. (Daten aus 15 Membranflecken, die Einzeldaten wurden auf den Wert bei ca.  $150 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  normiert, Angaben in  $\bar{x} \pm SD$ , Membranpotential 0 mV, extrazellulär 100 mM  $\text{Na}^+$  ( $\text{Ca}^{2+}$ -frei), DMN-Konzentrationen 60, 100, 200, 300, 750 und  $1500 \mu\text{M}$ )

verglichen wurde. Aus der so bestimmten abgeschätzten freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration konnte dann der Photolyseumsatz pro Laserenergiedichte errechnet werden. Unter Verwendung des Laserfarbstoffs BiBuQ zur Anregung des DM-Nitrophens sollten bei einer Energiedichte von ca.  $350 \text{ mJ/cm}^2$  demnach ca. 10% des DM-Nitrophens umgesetzt werden. Mittels dieses abgeschätzten Wertes für den Photolyseumsatz pro Laserenergiedichte wurde dann für alle weiteren DMN-Konzentrationen die freigesetzte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration abgeschätzt. Wie aus der Abbildung 4.7 ersichtlich ist, lässt sich die so gewonnene  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit des stationären Stroms sehr gut mit einer Michaelis-Menten-Kinetik ( $K_M = 5.6 \pm 0.4 \mu\text{M}$ ,  $\bar{x} \pm SD$ ) anpassen. Der  $K_M$ -Wert liegt damit relativ nahe bei dem aus dem Lösungswechselexperiment bestimmten Wert, was für eine Abschätzung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung alleine über die eingesetzte Laserenergiedichte und der DMN-Konzentration spricht. Dies war für spätere Messungen im  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch von Bedeutung, wo eine Abschätzung der freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration über einen stationären Strom nicht möglich war. Die Daten in der Abbildung stammen aus Messungen an 15 verschiedenen Membranflecken. Nahe beieinander liegende  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen wurden zusammengefasst, da die  $\text{Ca}^{2+}$ -

Konzentrationen durch Variationen der Laserenergie streuten und damit nicht einheitlich bei den Messungen an den verschiedenen Membranflecken bzw. innerhalb der Messung an einem einzelnen Patch waren. Zudem wurden die Daten der Einzelmessungen auf den stationären Strom bei ca. 150  $\mu\text{M}$  Ca<sup>2+</sup> (Sättigung des stationären Stroms) normiert.



Abbildungung 4.8: Ca<sup>2+</sup>-Abhängigkeit des Spitzenstromsignals Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-Austausch

Die Ca<sup>2+</sup>-Abhängigkeit des Spitzenstroms lässt sich ebenfalls mit einer Michaelis-Menten-Kinetik anpassen. Im Gegensatz zum stationären Austauschstrom liegt der  $K_M$ -Wert bei  $30.9 \pm 3.0 \mu\text{M}$  Ca<sup>2+</sup> und damit um ein vielfaches höher als der  $K_M$ -Wert für die Ca<sup>2+</sup>-Abhängigkeit des stationären Stroms. (Daten aus 15 Membranflecken, die Einzeldaten wurden auf den Wert bei ca. 150  $\mu\text{M}$  Ca<sup>2+</sup> normiert, Angaben in  $\bar{x} \pm SD$ , weitere Versuchsbedingungen siehe Abb. 4.7 bzw. Text)

In Abbildung 4.8 ist die Ca<sup>2+</sup>-Abhängigkeit des Spitzenstromsignals der selben Messungen wie in Abbildung 4.7 dargestellt. Die Daten wurden wieder auf den Wert bei ca. 150  $\mu\text{M}$  Ca<sup>2+</sup> normiert. Es ist deutlich zu erkennen, dass der Spitzenstrom bei einer wesentlich höheren Ca<sup>2+</sup>-Konzentration sättigt als der stationäre Strom. Die Ca<sup>2+</sup>-Abhängigkeit lässt sich mit einer Michaelis-Menten-Kinetik mit den Parametern  $K_M = 30.9 \pm 3.0 \mu\text{M}$  und  $I_{\max} = -121.4 \pm 3.6$  ( $\bar{x} \pm SD$ ) anpassen. Der  $K_M$ -Wert des Spitzenstroms liegt damit um etwa einen Faktor fünf höher als der des stationären Stroms.

Abbildungung 4.9A und B zeigen die Ca<sup>2+</sup>-Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten  $1/\tau_{\text{Abfall}}$  des Signalabfalls vom Spitzenstrom auf den stationären Strom. Da die Geschwindigkeitskonstante zwischen den Messungen an einzelnen Membranflecken schwankte (bedingt insbesondere durch die Unsicherheit bei der Abschätzung der freien Ca<sup>2+</sup>-Konzentration und Unsicherheiten bei der Anpassung des Signals mit Exponentialfunktionen bei schwankender Signalqualität), streuen die gemittelten Datenpunkte in (A) stärker als in den Abbildungen 4.7 und 4.8. Dennoch ist eindeutig zu erkennen, dass die Geschwindigkeitskonstante bei zunehmender Ca<sup>2+</sup>-Konzentration sättigt. Dies zeigt auch der Vergleich mit den Daten einer Einzelmessung in (B). Ein Fit mit einer Michaelis-Menten-Funktion ergibt einen  $K_M$ -Wert von  $98.5 \pm 21.3 \mu\text{M}$  bzw.  $100.1 \pm 35.6 \mu\text{M}$  und ein  $(1/\tau)_{\max}$  von  $9700 \pm 950 \text{ s}^{-1}$  bzw.  $9460 \pm 1900 \text{ s}^{-1}$ . Damit liegt der  $K_M$ -Wert deutlich höher als der für den stationären Strom gefundenen Wert. Er liegt auch über dem  $K_M$ -Wert der

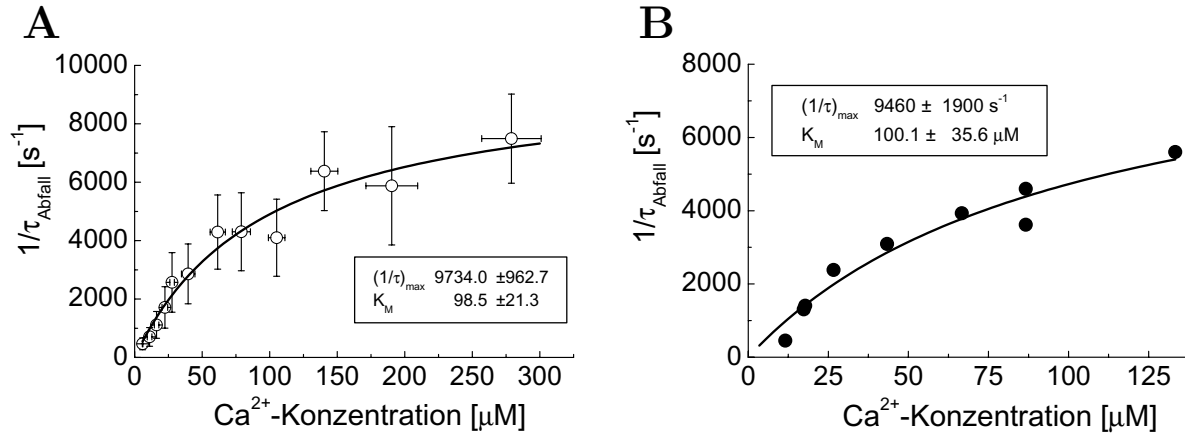


Abbildung 4.9:  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten des Signalabfalls  
 Eine Anpassung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten des Signalabfalls des transienten Austauscherstroms mit einer Michaelis-Menten-Kinetik ergibt einen  $K_M$ -Wert von  $98.5 \pm 21.3 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ . Der  $K_M$ -Wert liegt damit deutlich höher als der des stationären Stromsignals.  
 (Daten aus 15 Membranflecken in (A), Daten einer exemplarischen Einzelmessung in (B), Angaben in  $\bar{x} \pm SD$ , weitere Versuchsbedingungen siehe Abb. 4.7 bzw. Text)

	$\bar{x} \pm SD$	Anzahl Patches	Messmethode
$K_{M,stat.}^{\text{Ca}^{2+}}$	$7.0 \pm 0.5 \mu\text{M}$	$n=10$	Lösungswechsel
$K_{M,stat.}^{\text{Ca}^{2+}}$	$5.6 \pm 0.4 \mu\text{M}$	$n=15$	Photolyse
$K_{M,Spitzenstrom}^{\text{Ca}^{2+}}$	$30.9 \pm 3.0 \mu\text{M}$	$n=15$	Photolyse
$K_{M,1/\tau}^{\text{Ca}^{2+}}$	$98.5 \pm 21.3 \mu\text{M}$	$n=15$	Photolyse

Tabelle 4.1:  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinitäten des stationären Stroms, des Spitzenstroms und der Geschwindigkeitskonstanten  $1/\tau$  des Signalabfalls im  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch

$\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit des Spitzenstroms.

Tabelle 4.1 fasst die apparenten  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinitäten des stationären Stroms, des Spitzenstroms und der Geschwindigkeitskonstanten des Signalabfalls zusammen.

Der Signalanstieg des Vergleichgewichtstromsignals lässt sich nur schwer auswerten, da er zum einen durch die messtechnisch mögliche Zeitauflösung limitiert ist und vom Laserartefakt bzw. vom *forced reset* des Verstärkers überlagert wird. Zum anderen tritt die zweite, langsame Anstiegsphase nur bei niedrigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen auf und geht bei steigender  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in die schnelle Phase über. Dadurch wird das Anpassen des biphasischen Anstiegs mit zwei Exponentialfunktionen erschwert. Der Anstieg wurde daher nur an einem exemplarischen Membranflecken ausgewertet. Abbildung 4.10 A und B zeigen die  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit des biphasischen Anstiegs bei niedrigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen, der mit zwei Exponentialfunktionen angepasst wurde: Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten  $1/\tau_{2,\text{Anstieg}}$  der langsamen Phase ist in Abbildung 4.10 A dargestellt. Zwischen 5 und 20  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  lassen sich die Daten mit einer linearen Regressionsgeraden anpassen. Die Geschwindigkeitskonstante ändert sich dabei

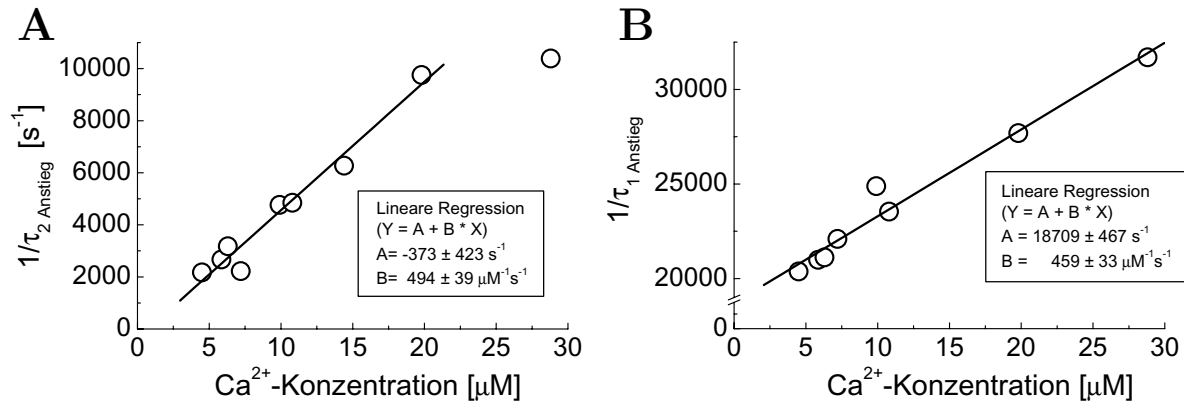


Abbildung 4.10:  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten des Signalanstiegs im  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch

(A) Eine Auswertung des Signalanstiegs bei niedrigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen nach der Photolyse an einem exemplarischem Membranpatch ergibt einen linearen Zusammenhang zwischen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und der Geschwindigkeitskonstanten  $1/\tau_2$  für die langsame Phase des Signalanstiegs. Zwischen 5 und 20  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  ändert sich die Geschwindigkeitskonstante um den Faktor fünf. Als Parameter einer linearen Regression ergeben sich  $494 \pm 39 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  ( $\equiv 4.94 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) für die Steigung und  $-373 \pm 423 \text{ s}^{-1}$  für den Y-Achsenabschnitt. Die Steigung liefert dabei möglicherweise einen Hinweis auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Assoziationsrate.

(B) Die Geschwindigkeitskonstante  $1/\tau_1$  der schnellen Phase lässt sich schwieriger auswerten, da sie an der Grenze der messtechnisch möglichen Auflösung liegt bzw. wahrscheinlich durch diese bestimmt wird. Sie zeigt im Vergleich zu  $1/\tau_2$  nur eine sehr schwache  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit. Die Steigung einer linearen Regressionsgeraden von  $459 \pm 33 \mu\text{M}$  ist dabei zwar prinzipiell in Übereinstimmung mit den Daten aus (A), eine sinnvolle Auswertung erscheint aber fragwürdig.

(Membranpotential 0 mV, DMN-Konzentrationen 60, 100 und 200  $\mu\text{M}$ , extrazellulär 100 mM  $\text{Na}^+$ )

um den Faktor fünf von  $2000 \text{ s}^{-1}$  auf  $10000 \text{ s}^{-1}$ . Bei höheren  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen ist die langsame Phase nicht mehr von der schnellen Phase trennbar und sättigt wahrscheinlich. Die Steigung der Regressionsgeraden von  $494 \pm 39 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  repräsentiert hierbei eventuell die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsrate. Der nahe null liegende Y-Achsenschnitt-Parameter von  $-373 \pm 423 \text{ s}^{-1}$  sollte dann die  $\text{Na}^+$ -Relokationsrate des Transporters darstellen, die demnach sehr gering sein sollte. Ob diese Interpretation zulässig ist, wird die Diskussion der Ergebnisse zeigen müssen.

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der schnellen Phase ist dagegen weniger eindeutig (siehe Abbildung 4.10B). Die Steigung von  $459 \pm 33 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  einer linearen Regressionsgeraden ist zwar prinzipiell in Übereinstimmung mit den Fitparametern aus (A), allerdings ist die  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit zu schwach (maximal Faktor zwei zwischen 5 und 30  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ ) und die schnelle Phase des Anstieg zudem zu sehr durch den Laserartefakt bzw. den *forced reset* beeinflusst. Zudem steigt die schnelle Phase so steil an, dass die messtechnisch mögliche Zeitauflösung (Bandbreite des Systems) limitierend wirkt. Eine sinnvolle Auswertung der schnellen Phase ist daher fragwürdig.

### 4.2.2 Spannungsabhängigkeit des einwärtsgerichteten $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Transports

Die Messungen zur Spannungsabhängigkeit des einwärtsgerichteten  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Transports wurden unter den gleichen Versuchsbedingungen wie die Messungen zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit durchgeführt. Es wurde lediglich zusätzlich das Membranpotential zwischen -75 und +75 mV in 25 mV-Schritten variiert. Hierzu wurde das Membranpotential mittels einer Spannungsrampe auf das gewünschte Haltepotential gefahren, bevor mit einem Laserpuls ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung durch Photolyse verschiedener DM-Nitrophen-Konzentrationen ausgelöst wurde (siehe Spannungsprotokoll in Abbildung 4.11). Als problematisch erwies sich dabei die oftmals auftretende Instabilität der Membranflecken bei stark hyper- bzw. depolarisierenden Membranpotentialen und gleichzeitiger Belichtung mit einem hochenergetischem Laserpuls.

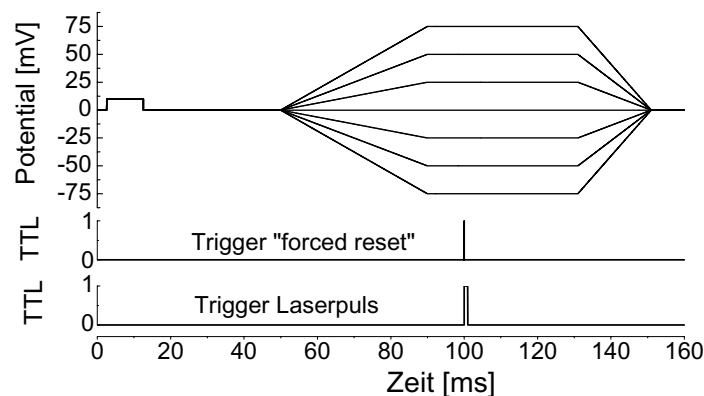


Abbildung 4.11: Spannungsprotokoll

Zu Beginn des Protokolls wird ein 10 mV-Puls angelegt, um den Abdichtwiderstand zu kontrollieren. Über eine Spannungsrampe wird dann das gewünschte Haltepotential zwischen -75 und +75 mV eingestellt. Nach Einstellung des Haltepotentials wird zunächst der *forced reset* und 20  $\mu\text{s}$  später der Laserpuls (hier: Zeitpunkt  $t=100$  ms, für die weiteren Abbildungen auf  $t=0$  ms umskaliert, um den Zeitpunkt des  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung besser zu verdeutlichen) über einen TTL-Puls ausgelöst. 30 ms später wird über eine Rampe wieder ein Haltepotential von 0 mV eingestellt, um die Membran nicht unnötig zu belasten.

Abbildung 4.12 A bis D zeigt eine typische Messung an einem exemplarischem Membranpatch. Die freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nach dem Laserpuls zum Zeitpunkt  $t=0$  ms betrug ca. 153  $\mu\text{M}$  (Abb. 4.12 A), 76  $\mu\text{M}$  (B), 30  $\mu\text{M}$  (C) bzw. 6  $\mu\text{M}$  (D) und wurde über die eingesetzte Laserenergiedichte abgeschätzt. In der Abbildung sind die Vergleichsgewichtsströme bei -75, 0 und +75 mV Membranpotential dargestellt. Zu erkennen ist, dass sowohl die Spitzenstromamplitude als auch die Amplitude des stationären Stroms mit zunehmender Depolarisation abnehmen. Das Abklingen des Spitzenstroms auf den stationären Strom scheint dagegen vom Membranpotential unbeeinflusst zu sein. Gleiches gilt für die langsame Phase des Signalanstiegs, die nur bei niedriger  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auftritt. Eine detaillierte Auswertung der Spannungsabhängigkeit der einzelnen Signalkomponenten erfolgt in den Abbildungen 4.13 bis 4.16. In der Abbildung 4.12 ist zugleich nochmals die  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit des vorstationären Stromsignals gut zu erkennen: Während in (B) im

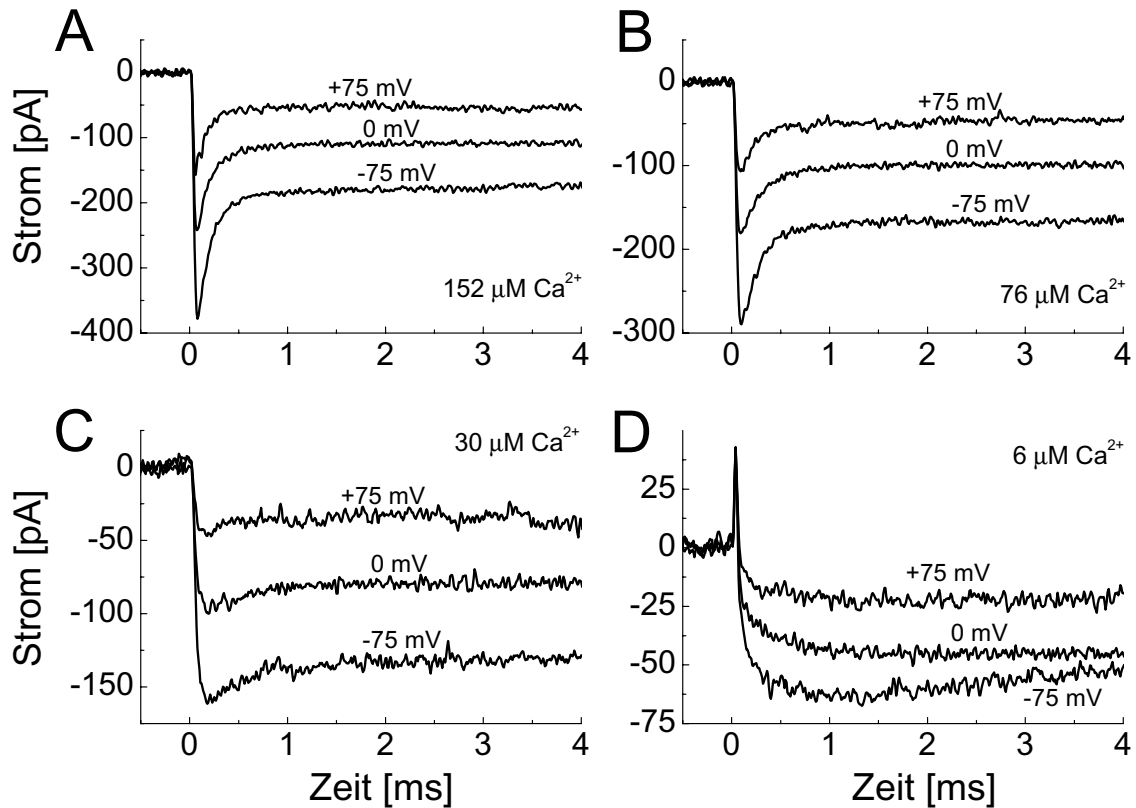


Abbildung 4.12: Vorstationäres Stromsignal des einwärtsgerichteten  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Transports bei verschiedenen Membranpotentialen und  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen

A Spannungsabhängigkeit des vorstationären Stromsignals bei sättigendem  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung auf  $152 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ : Sowohl der Spitzen- als auch der stationäre Strom nehmen mit zunehmender Depolarisation ab. Der Signalabfall zeigt keine auffällige Spannungsabhängigkeit.

B  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung auf  $76 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ : Das Verhalten von Spitzenstrom, stationärem Strom und Signalabfall bei zunehmender Membran-Depolarisation entspricht dem in (A). Im Vergleich zu (A) ist die unterschiedliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit von stationärem Strom und Spitzenstrom bzw. Signalabfall zu erkennen: Während der stationäre Strom noch gesättigt ist, hat der Spitzenstrom abgenommen bzw. das Signal klingt langsamer ab.

C und D Das spannungsabhängige Verhalten des Austauscherstrom nach einem Sprung auf  $30$  bzw.  $6 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  entspricht wieder dem aus (A): Es ist keine auffällige Spannungsabhängigkeit des Signals zu erkennen. Auch die nur bei niedrig  $\text{Ca}^{2+}$  zu erkennende langsame Phase im Signalanstieg scheint spannungsunabhängig zu sein. Der Signalabfall nach einigen Millisekunden in (D) bei  $-75 \text{ mV}$  ist auf die Instabilität des Membranflecks bei diesem Membranpotential zurückzuführen.

Alle Daten stammen vom selben Membranpatch. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrations Sprünge wurden durch Photolyse (Laserpuls zum Zeitpunkt  $t=0 \text{ ms}$ ) verschiedener DMN-Konzentrationen ( $1500$ ,  $750$ ,  $300$  und  $60 \mu\text{M}$ ) erreicht. Die Signale bei den verschiedenen Membranpotentialen wurden zur besseren Vergleichbarkeit übereinander gelegt und die Leckströme vor dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung ( $t=0 \text{ s}$ ) subtrahiert.

Vergleich zu (A) der stationäre Strom noch gesättigt ist, zeigt der Spitzenstrom bereits eine deutliche Abnahme. Bei niedriger freier  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nach der Photolyse tritt kein Signalüberschwinger mehr auf (D). Stattdessen zeigt das Signal einen biphasischen Anstieg auf den stationären Strom. Der Signalabfall des stationären Stroms bei -75 mV in (D) ist auf die Instabilität des Membranflecks bei Anlegen des Membranpotentials und gleichzeitiger Belichtung mit dem UV-Laserpuls zurückzuführen.

Abbildung 4.13 A zeigt die Spannungsabhängigkeit des stationären Stroms bei vier verschiedenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen am Beispiel eines ausgewählten Membranflecks.

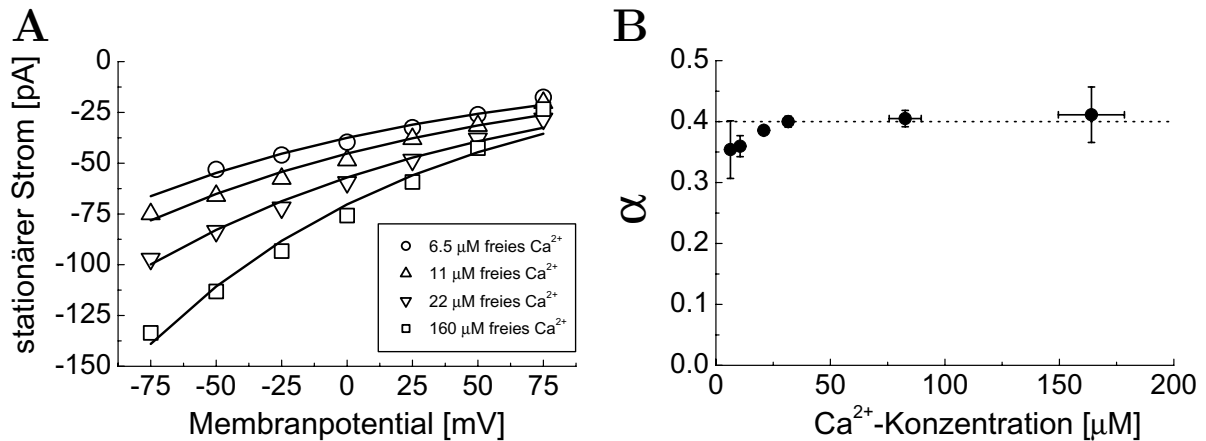


Abbildung 4.13: Spannungsabhängigkeit des stationären Stromsignals bei verschiedenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen

A Stromamplitude des stationären Signals eines exemplarischen Membranpatches bei verschiedenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen zwischen -75 und +75 mV Membranpotential: Deutlich zu erkennen ist die Abnahme der Stromamplitude bei zunehmender Depolarisation der Membran. Bei einer Änderung des Membranpotentials um 100 mV ändert sich die Amplitude um etwa den Faktor zwei. Die Daten wurden mit der Funktion  $I = I_0 \cdot \exp\left(-\frac{V_M e_0 \alpha}{2kT}\right)$  angepasst.

B  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit des Dielektrizitätskoeffizienten  $\alpha$ , wie er in (A) beispielhaft bestimmt wurde: Im untersuchten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsbereich zwischen 5 und 180 µM zeigt der Dielektrizitätskoeffizient nur eine sehr schwache  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit und liegt zwischen 0.35 und 0.40 mit Tendenz zur Abnahme bei niedrigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen.

(Daten aus 3 verschiedenen Membranflecken, Fehlerbalken in  $\bar{x} \pm SD$ )

Zu erkennen ist die Abnahme der Stromamplitude bei einer Depolarisation der Membran. Bei einer Änderung des Membranpotentials um 100 mV ändert sich die Stromamplitude um etwa den Faktor zwei bei allen untersuchten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen. In der Abbildung ist ein Fit der Daten mit der Funktion

$$I = I_0 \cdot \exp\left(-\frac{V_M e_0 \alpha}{2kT}\right)$$

eingezeichnet (Läuger, 1991). Der Dielektrizitätskoeffizient  $\alpha$  ist dabei ein Maß für die Spannungsabhängigkeit. Er ist in Abbildung 4.13 B in Abhängigkeit von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration dargestellt. Die Daten stammen von drei verschiedenen Membranflecken. Der

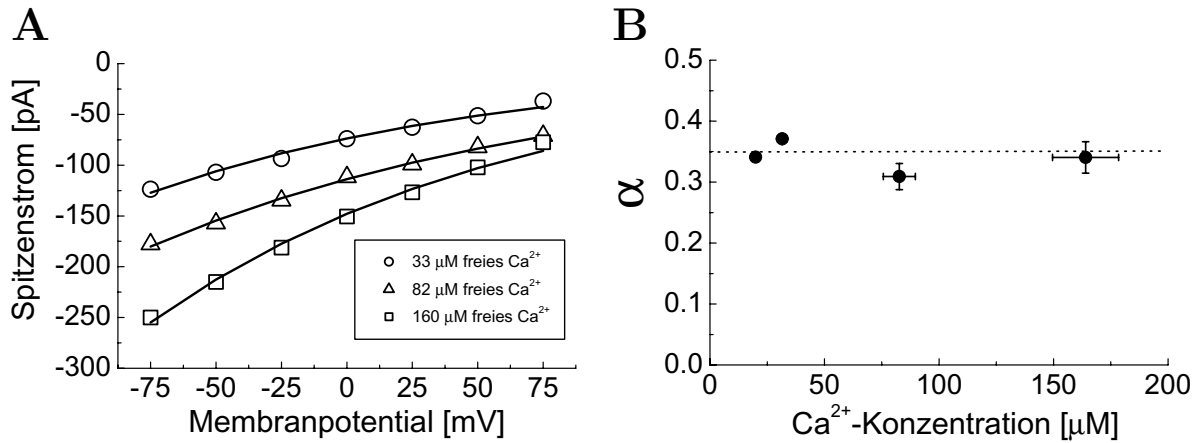


Abbildung 4.14: Spannungsabhängigkeit des Spitzenstromsignals bei verschiedenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen

A Stromamplitude des Spitzenstroms eines exemplarischen Membranfleckens bei verschiedenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen zwischen -75 und +75 mV Membranpotential: Wie der stationäre Strom nimmt auch der Spitzenstrom mit zunehmender Depolarisation ab. Eingezeichnet ist wieder ein Fit mit der Funktion  $I = I_0 \cdot \exp\left(-\frac{V_M e_0 \alpha}{2kT}\right)$ .

B  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit des Dielektrizitätskoeffizienten  $\alpha$  des Spitzenstroms: Er liegt über den gesamten untersuchten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsbereich bei ca. 0.35 und zeigt damit kein  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiges Verhalten. (Daten aus 3 verschiedenen Membranflecken, Fehlerbalken in  $\bar{x} \pm SD$ )

Dielektrizitätskoeffizient liegt zwischen 0.35 und 0.4 mit einer leichten Tendenz zur Abnahme bei abnehmender  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Insgesamt zeigt der stationäre Strom damit nur eine relativ schwach ausgeprägte Spannungsabhängigkeit im untersuchten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsbereich zwischen 5 und 180 µM.

Die Spannungsabhängigkeit des Spitzenstroms bei verschiedenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen ist in Abbildung 4.14 A und B dargestellt. Die Daten in (A) stammen vom gleichen exemplarischen Membranpatch wie in Abbildung 4.13 A. Der Spitzenstrom nimmt ebenso wie der stationäre Strom bei einer Depolarisation der Membran ab. Bei einer Änderung des Membranpotentials um 100 mV ändert sich die Amplitude des Spitzenstroms um nicht ganz den Faktor zwei. Die Spannungsabhängigkeit des Spitzenstroms ist damit nur unwesentlich schwächer als die des stationären Stroms. Dies zeigt auch der Dielektrizitätskoeffizient  $\alpha$ , der in (B) wieder in Abhängigkeit von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration dargestellt ist: Er liegt bei ca. 0.35 im gesamten untersuchten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsbereich und zeigt damit keine  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit. Die Daten stammen wieder von drei verschiedenen Membranflecken. Der Spitzenstrom ist demnach wie der stationäre Strom nur schwach spannungsabhängig.

Abbildung 4.15 zeigt die Spannungsabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten des Signalabfalls vom Spitzen- auf den stationären Wert bei verschiedenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen. Da die Geschwindigkeitskonstante, wie bereits bei den Messungen zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit erwähnt, Schwankungen zwischen den einzelnen Membranflecken zeigte, sind in der Abbildung die Daten einer exemplarischen Messung dargestellt. Deutlich zu erkennen ist die bereits im letzten Abschnitt gezeigte  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der Geschwin-



digkeitskonstanten. Sie ist dagegen zwischen  $-75$  mV und  $+75$  mV bei allen untersuchten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen nicht spannungsabhängig. Diese Spannungsunabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten  $1/\tau_{\text{Abfall}}$  konnte bei Messungen an mehreren Membranflecken mit sehr gutem Signal-Rausch-Verhältnis eindeutig bestätigt werden.

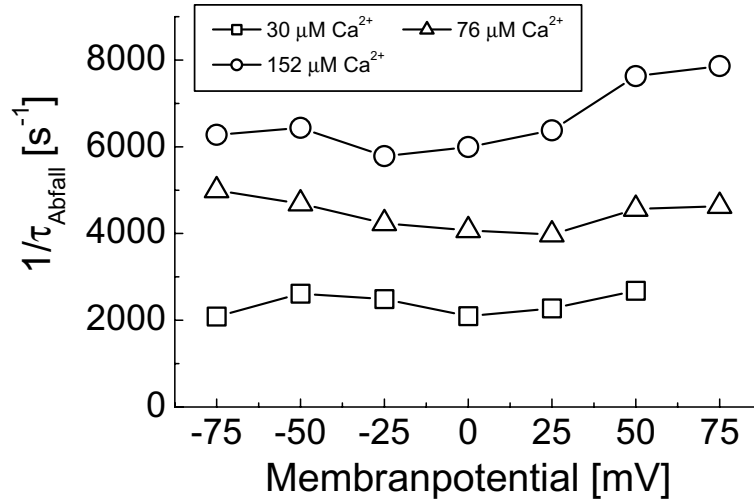


Abbildung 4.15: Spannungsabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten des Signalabfalls bei verschiedenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen

Die Geschwindigkeitskonstante  $1/\tau_{\text{Abfall}}$  zeigt kein spannungsabhängiges Verhalten zwischen  $-75$  und  $+75$  mV. Dagegen ist die  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten zwischen  $30$  und  $152 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  deutlich zu erkennen.

Die Daten stammen von einem exemplarischen Membranflecken und konnten an weiteren Membranflecken und  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprüngen bestätigt werden.

Die Auswertung der Spannungsabhängigkeit des Signalanstiegs gestaltete sich wiederum schwierig, da die schnelle Phase des Anstiegs durch das zeitliche Auflösungsvermögen der Messapparatur und des Messobjekts selbst (Bandbreite, Schaltung des *forced-reset*) beschränkt wird. Die langsame Phase tritt dagegen nur bei sehr niedrigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprüngen auf und ist, bedingt durch das schlechtere Signal-Rausch-Verhältnis, mit Unsicherheiten beim Anpassen mit einer Exponentialfunktion verbunden. Die Spannungsabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten  $1/\tau_{1,\text{Anstieg}}$  und  $1/\tau_{2,\text{Anstieg}}$ , gemessen an einem ausgewählten Membranpatch, ist in Abbildung 4.16 A und B dargestellt. Beide Geschwindigkeitskonstanten zeigen keine Spannungsabhängigkeit zwischen  $-75$  und  $+75$  mV Membranpotential. Wegen der oben angeführten Gründe lässt sich aber keine abschließende Beurteilung der Spannungsabhängigkeit treffen, wenn auch weitere Membranflecken ein ähnliches Verhalten zeigten.

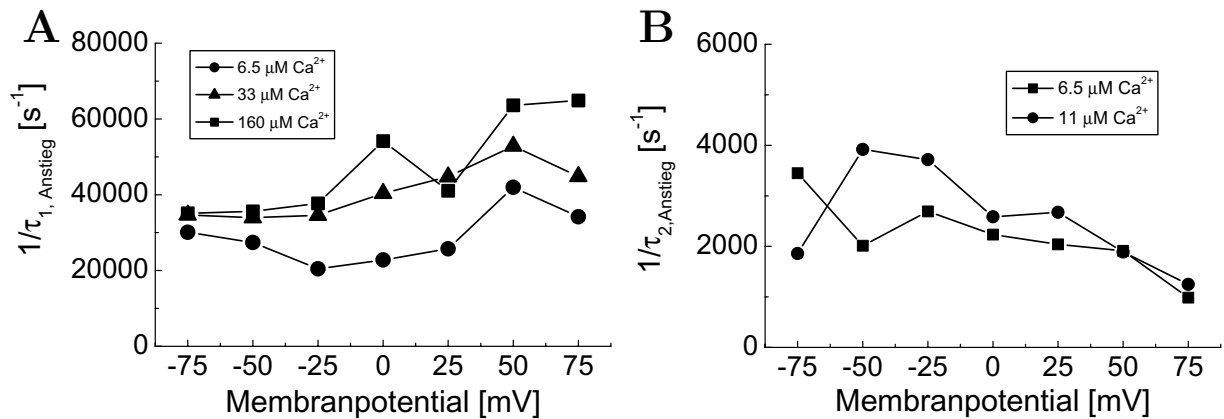


Abbildung 4.16: Spannungsabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten des Signalanstiegs

Sowohl die Geschwindigkeitskonstante der schnellen Phase (A) als auch der langsamen Phase (B) des Signalanstiegs des  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Transports scheinen spannungsunabhängig zu sein. Allerdings ist die schnelle Phase durch die messtechnisch mögliche Zeitauflösung (Bandbreite des Systems, *forced reset*-Schaltung) limitiert. Die ermittelte Größenordnung der Geschwindigkeitskonstanten der schnellen Phase von ca.  $40000 \text{ s}^{-1}$  entspricht denn auch der bei der eingesetzten Filterbandbreite von 10 kHz zu erwartenden Größenordnung. Die langsame Phase ist dagegen nur schwer durch eine Exponentialfunktion anzupassen, da sie nur bei niedrigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen zu sehen ist und dann in die schnelle Phase übergeht. Eine eindeutige Aussage über die Spannungsabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten des Signalanstiegs ist daher abschließend nicht möglich.

### 4.3 Messungen im $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch-Modus

Der  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch-Modus des  $\text{Na}^{+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers bietet den großen Vorteil, dass man gezielt nur den  $\text{Ca}^{2+}$ -Translokationszweig des  $\text{Na}^{+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Transportzyklus (im Rahmen eines konsekutiven Reaktionsmodells) untersuchen kann. Dies vereinfacht die spätere Analyse der Messdaten, da durch die Betrachtung des Halbzyklus leichter Rückschlüsse aus den gewonnenen Messdaten auf die zugrunde liegenden Reaktionsschritte gezogen werden können.

Bei den Messungen zum  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch enthielt die extrazelluläre (Pipetten-) Lösung 5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  anstatt  $\text{Na}^{+}$ .  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrations sprünge auf der intrazellulären Seite wurden wieder durch Photolyse unterschiedlicher DMN-Konzentrationen ( $\approx 60, 120, 230, 300, 400, 750, 900, 5800 \mu\text{M}$ ,  $\pm 10\%$  bedingt durch Ansetzen der Lösungen) bei variierendem Haltepotential hervorgerufen.

#### 4.3.1 $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit des $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Transports

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit des vorstationären Stromsignals im  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Transportmodus des Austauschers soll zunächst bei 0 mV Membranpotential betrachtet werden. Eine Erweiterung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit durch die Variation des Membranpotentials erfolgt dann im nächsten Abschnitt.

Abbildung 4.17 zeigt eine typische Messung, bei der die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zwischen 10 und 500  $\mu\text{M}$  variiert wurde. Das durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrations sprünge hervor-

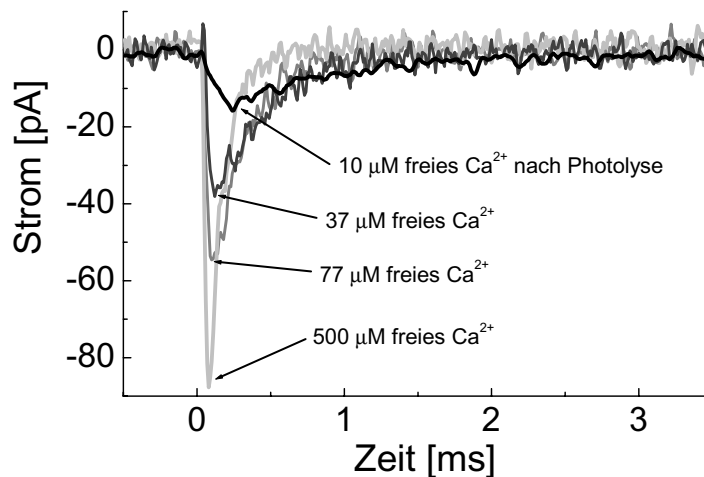


Abbildung 4.17: Vorstationäres Stromsignal bei verschiedenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen im  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wurde zwischen 10 und 500  $\mu\text{M}$  variiert. Es zeigt sich eine deutliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit des transienten Stromsignals: Bei abnehmender  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wird der Spitzenstrom deutlich kleiner und fällt langsamer auf den stationären Wert ab.

(intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrations sprünge auf 10, 37, 77 und 500  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ , 5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  extrazellulär, Membranpotential 0 mV, Filterbandbreite 5 bzw. 10 kHz entsprechend Signalgröße. Die verschiedenen Messungen an einem Einzelpatch wurden zur Verdeutlichung übereinandergelegt.)

gerufene vorstationäre Stromsignal zeigt eine deutliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit: Bei kleinen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprüngen ist der Spitzenstrom deutlich kleiner und das Signal fällt langsamer, ohne jeglichen stationären Stromanteil, auf 0 pA ab.

Im Gegensatz zum  $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ -Austausch gibt es im  $\text{Ca}^{2+}\text{-Ca}^{2+}$ -Austausch nur ein transientes Stromsignal und keinen von null verschiedenen stationären Strom, da keine Nettoladung verschoben wird. Dieser fehlende stationäre Strom erschwert eine Bestimmung der freigesetzten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Es kann daher nur eine Abschätzung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration über die eingesetzte Laserenergiedichte und der DMN-Konzentration erfolgen. Eine Normierung mehrerer Einzelmessungen ist deshalb schwieriger als bei den Messungen im  $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ -Austausch-Modus. Im folgenden werden daher exemplarische Einzelmessungen dargestellt, sofern das gezeigte Verhalten an weiteren Membranflecken bestätigt werden konnte.

Eine genauere Analyse der  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit des Spitzenstroms und der zum Signalabfall korrespondierenden Geschwindigkeitskonstanten  $1/\tau_{\text{Abfall}}$  des Signalabfalls zeigt Abbildung 4.18 A und B. Die Daten stammen von einem exemplarischen Membran-

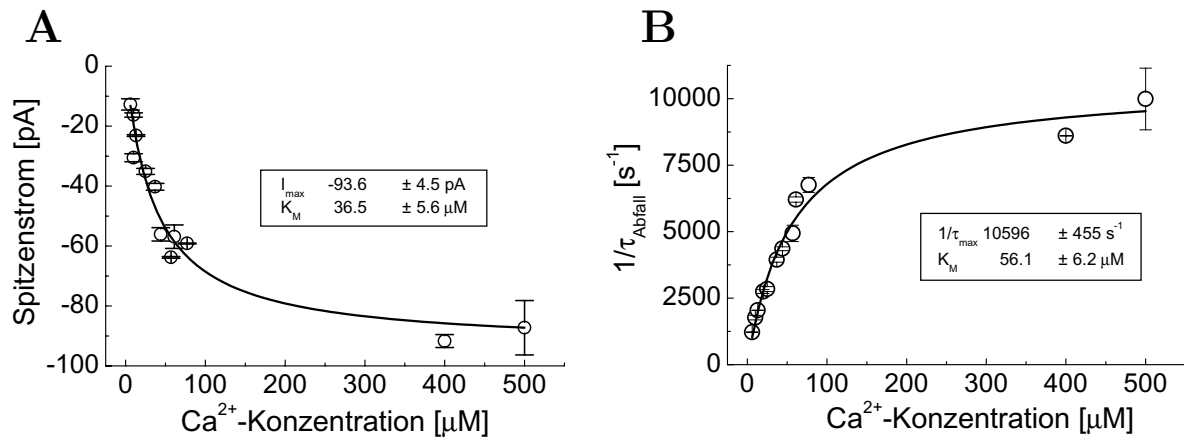


Abbildung 4.18:  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit des Spitzenstroms und der Geschwindigkeitskonstanten des Signalabfalls im  $\text{Ca}^{2+}\text{-Ca}^{2+}$ -Austausch

Sowohl der Spitzenstrom (A) als auch die Geschwindigkeitskonstante (B) sättigen bei hohen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen. Die Daten lassen sich mit einer Michaelis-Menten-Funktion anpassen und ergeben apparente Affinitäten von  $36.5 \pm 5.6 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  (Spitzenstrom) bzw.  $56.1 \pm 6.2 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  (Geschwindigkeitskonstante).

(Daten eines exemplarischen Membranpatches, Fehlerbalken in Abbildung: Mittelwerte aus 2 bis 3 Messungen am selben Patch)

patch. Es ist deutlich zu erkennen, dass sowohl der Spitzenstrom (Abb. 4.18 A) als auch die Geschwindigkeitskonstante  $1/\tau$  des Signalabfalls (Abb. 4.18 B) bei hohen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen sättigen. Die Daten lassen sich mit einer Michaelis-Menten-Funktion anpassen. Die so ermittelten apparenten Affinitäten aus drei Einzelmessungen sowie die Mittelwerte sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst. Zusätzlich ist in der Tabelle die maximale Geschwindigkeitskonstante  $(1/\tau)_{\text{max}}$  angegeben, da diese für die spätere Diskussion von Bedeutung ist. Wie bereits beim  $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ -Austausch liegen die  $K_M$ -Werte für den Spitzenstrom und für die Geschwindigkeitskonstante deutlich höher als für den sta-

	Messung 1	Messung 2	Messung 3	$\bar{x} \pm SE$
$K_{M, \text{Spitzenstrom}}^{\text{Ca}^{2+}}$	66 $\mu\text{M}$	68 $\mu\text{M}$	37 $\mu\text{M}$	$57 \pm 10 \mu\text{M} (n=3)$
$K_{M, 1/\tau}^{\text{Ca}^{2+}}$	80 $\mu\text{M}$	92 $\mu\text{M}$	56 $\mu\text{M}$	$76 \pm 11 \mu\text{M} (n=3)$
$(1/\tau)_{\text{max}}$	8810 $\text{s}^{-1}$	11240 $\text{s}^{-1}$	10600 $\text{s}^{-1}$	$10220 \pm 1030 \text{s}^{-1} (n=3)$

Tabelle 4.2:  $K_M$ -Werte des Spitzenstroms und der Geschwindigkeitskonstanten  $1/\tau$  bei 0 mV im  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch

tionären Strom im  $\text{Na}^{+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch. Berücksichtigt man die Ungenauigkeiten bei der Abschätzung der freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nach der Photolyse, dann stimmen die apparenten  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinitäten des Spitzenstroms und der Geschwindigkeitskonstanten im  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch mit denen im  $\text{Na}^{+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch weitestgehend überein.

Eine Integration des transienten Stromsignals ergibt die verschobene Ladung bei der Einstellung des neuen Gleichgewichtszustandes nach dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung. Diese verschobene Ladung ist in Abbildung 4.19 in Abhängigkeit von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration dargestellt. Im Gegensatz zum Spitzenstrom bzw. zur Geschwindigkeitskonstanten zeigt die verschobene Ladung praktisch keine  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit zwischen 6 und 400  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ . Dieses Verhalten konnte an mehreren Membranflecken reproduziert werden.

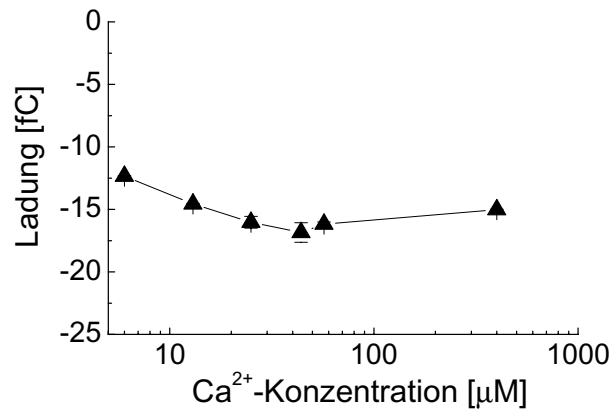


Abbildung 4.19:  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der verschobenen Ladung im  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch. Die verschobene Ladung, das heißt, das Integral des transienten Stromsignals, zeigt keine deutliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit im untersuchten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsbereich zwischen 6 und 400  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ . Die Daten stammen von einem exemplarischen Membranpatch.

### 4.3.2 Spannungsabhängigkeit des $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Transports

Während im vorangehenden Abschnitt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit des vorstationären Stroms im  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch bei 0 mV Membranpotential dargestellt wurde, erfolgt nun eine Erweiterung auf die Spannungsabhängigkeit.

Abbildung 4.20 A bis D zeigt das Verhalten des vorstationären Stroms bei vier  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen zwischen 10 und 500  $\mu\text{M}$  und Membranpotentialen von -75, 0 und

+75 mV an. Die Daten stammen vom selben Membranpatch. Zu erkennen ist, neben dem bereits bekannten  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Verhalten, eine deutliche Abnahme des Signals bei depolarisierenden Membranpotentialen. Das Abklingen des transienten Stromsignals scheint unabhängig vom Membranpotential zu sein.

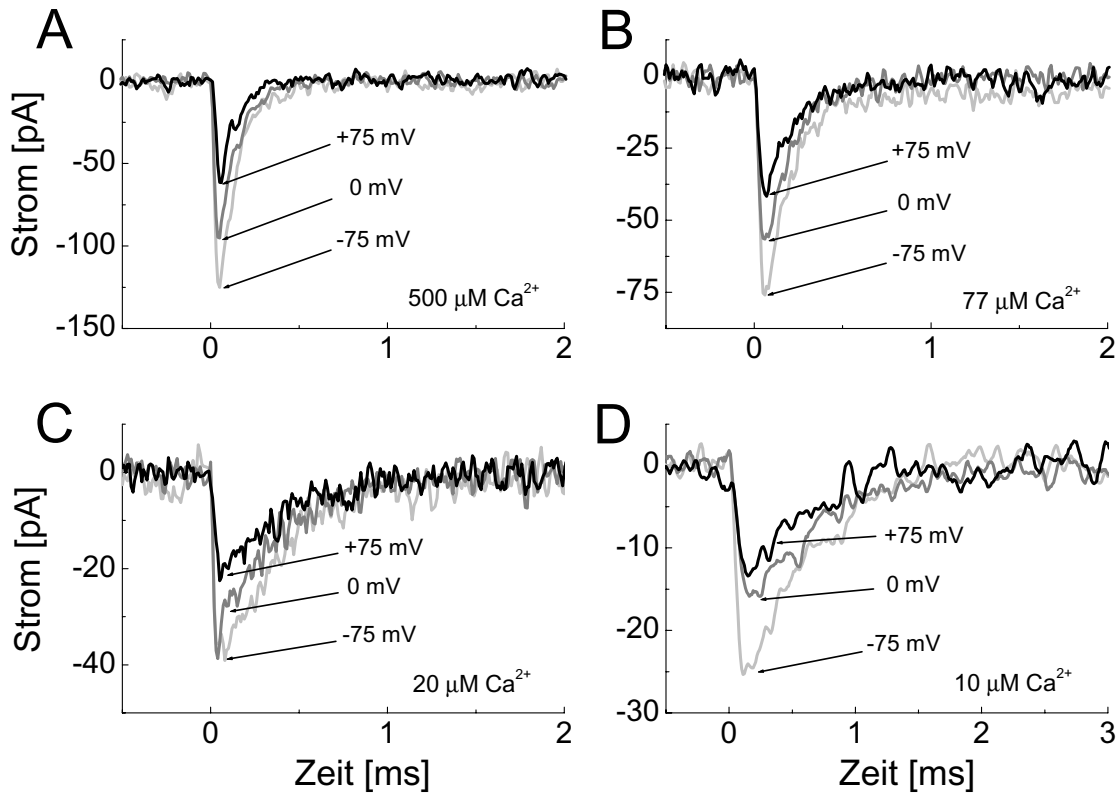


Abbildung 4.20: Das vorstationäre Stromsignal im  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch bei verschiedenen Membranpotentialen und  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen

A-D zeigt das spannungsabhängige Verhalten des vorstationären Stromsignals bei vier verschiedenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen. Zu erkennen ist die Signalabnahme bei Depolarisation der Membran. Dieses Verhalten ist unabhängig von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Das Abklingen des transienten Signals ist unabhängig vom Membranpotential, allerdings abhängig von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Alle Signale stammen vom gleichen Membranpatch und wurden zum besseren Vergleich bei der jeweiligen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration übereinandergelegt. Filterbandbreite 10 (A-C) bzw. 5 kHz (D).

Eine Betrachtung der Geschwindigkeitskonstanten  $1/\tau$  bestätigt diese Spannungsunabhängigkeit, wie Abbildung 4.21 zeigt: Im Bereich von -75 bis +75 mV ist die Geschwindigkeitskonstante unabhängig vom Membranpotential. Dagegen ist die  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit deutlich zu erkennen.

Diese Spannungsabhängigkeit des vorstationären Stromsignals spiegelt sich bei einer Bestimmung der apparenten  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinitäten des Spitzenstroms und der Geschwindigkeitskonstanten für Membranpotentiale zwischen -75 und +75 mV wider. Dies ist am Beispiel eines exemplarischen Membranpatches in Abbildung 4.22 A bis F dargestellt. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeiten des Spitzenstroms bzw. der Geschwindigkeitskonstanten wurden bei verschiedenen Membranpotentialen mit einer Michaelis-Menten-Kinetik angepasst (in der

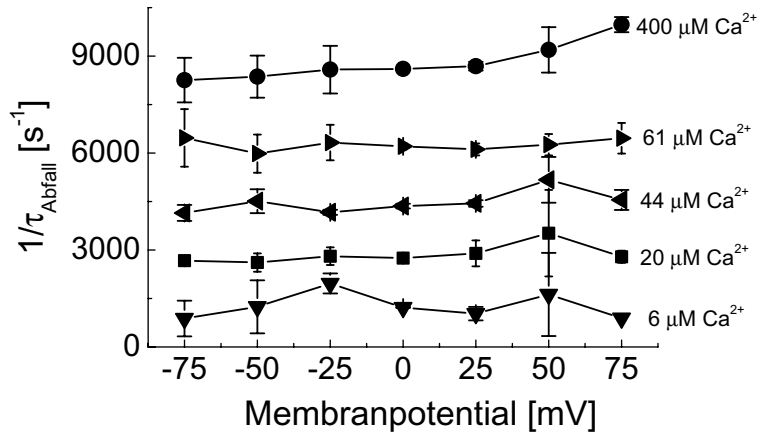


Abbildung 4.21: Spannungsabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten im  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch

Die Geschwindigkeitskonstante ist zwischen -75 und +75 mV unabhängig vom Membranpotential. Dagegen ist die starke  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit zu erkennen.

Die Daten stammen von 2 bis 3 Messungen am gleichen Membranpatch.

Abbildung am Beispiel -75 mV bzw. +75 mV gezeigt). Die so gewonnenen  $K_M$ -Werte des Spitzenstroms und der Geschwindigkeitskonstanten zeigen keine Spannungsabhängigkeit zwischen -75 und +75 mV (Abbildung 4.22 E und F).

Abbildung 4.23 zeigt die Spannungsabhängigkeit des Spitzenstroms bei vier verschiedenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen. Der Spitzenstrom nimmt bei einer Depolarisation der Membran ab. In (A) ist ein Fit der Daten mit der Funktion  $I = I_0 \cdot \exp(-\frac{V_M e_0 \alpha}{2kT})$  eingezeichnet. Der so gewonnene Dielektrizitätskoeffizient  $\alpha$  als Maß für die Spannungsabhängigkeit ist in (B) in Abhängigkeit von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration dargestellt. Er liegt im untersuchten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsbereich relativ konstant bei 0.2-0.25 und zeigt keine  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit. Er ist damit im Vergleich zum im  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch bestimmten Dielektrizitätskoeffizienten  $\alpha$  kleiner ( $\approx 0.22$  vs.  $\approx 0.4$ ).

Da das transiente Stromsignal eine Spannungsabhängigkeit zeigt (verdeutlicht in der Abnahme des Spitzenstroms), die Geschwindigkeitskonstante des Signalabfalls aber spannungsunabhängig ist, muss die verschobene Ladung vom Membranpotential abhängen. Eine Integration des Stromsignals bestätigt dies, wie Abbildung 4.24A verdeutlicht: Die verschobene Ladung (Absolutwerte) nimmt von ca. 22 fC bei -75 mV auf ca. 10 fC bei +75 mV ab (wobei negative Ladungen verschoben werden, da es sich um einen transienten Einwärtsstrom handelt). Die Ladungsverschiebung ist weitestgehend unabhängig von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Dies bestätigt auch eine Betrachtung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit bei verschiedenen Membranpotentialen (siehe Abbildung 4.19B), wobei die Integration des transienten Stromsignals insbesondere bei kleinen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen aufgrund des schlechten Signal-Rausch-Verhältnisses mit Unsicherheiten verbunden ist.

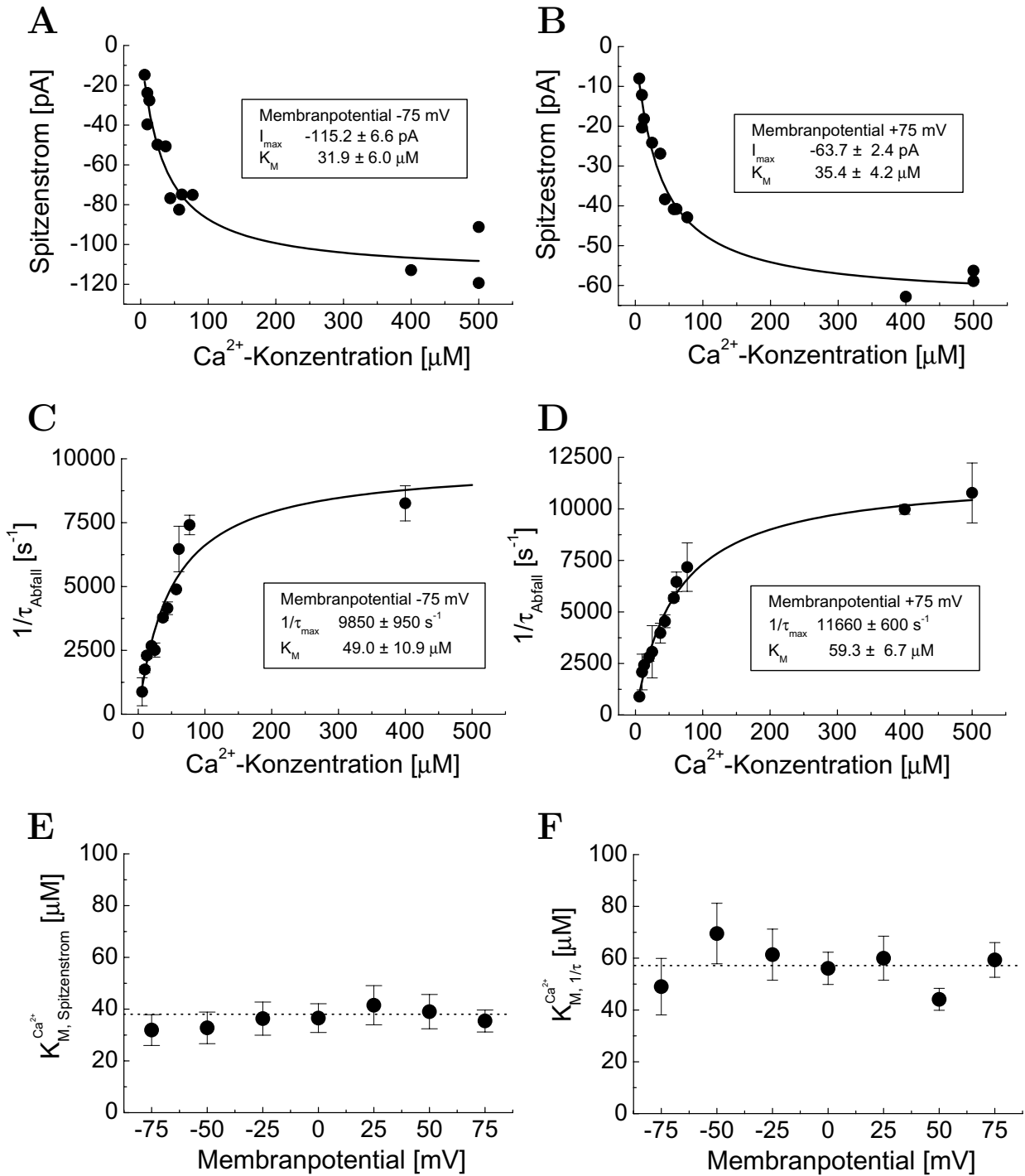
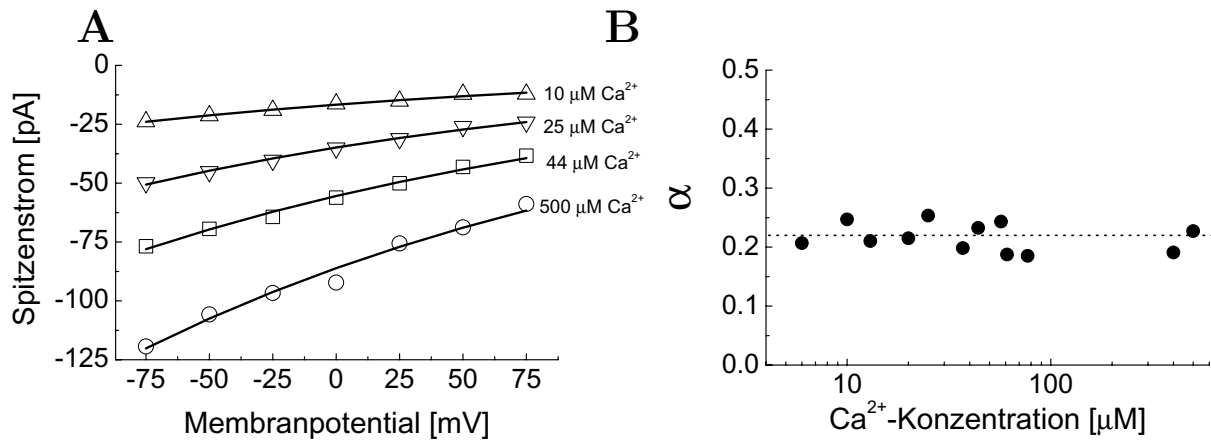


Abbildung 4.22: Spannungsabhängigkeit der apparenten  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinitäten des Spitzenstroms und der Geschwindigkeitskonstanten des Signalabfalls

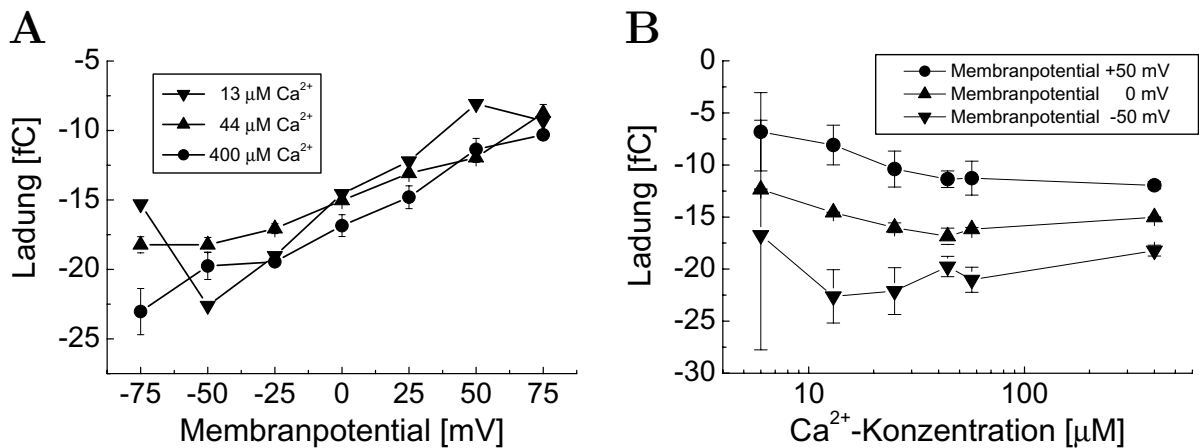
Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität des Spitzenstroms bzw. der Geschwindigkeitskonstanten wurde bei verschiedenen Membranpotentialen (beispielhaft in A und C bei -75 mV, B und D bei +75 mV) bestimmt, indem die Daten mit einer Michaelis-Menten-Funktion angepasst wurden. Die so gewonnenen  $K_M$ -Werte des Spitzenstroms (E) als auch der Geschwindigkeitskonstanten (F) zeigen keine Spannungsabhängigkeit. Die Daten stammen von einem exemplarischen Membranpatch.



Abbildung 4.23: Spannungsabhängigkeit des Spitzenstroms im  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch

A Der Spitzenstrom zeigt bei allen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen eine Abnahme bei einer Depolarisation der Membran. Eingezeichnet ist jeweils ein Fit mit der Funktion  $I = I_0 \cdot \exp(-\frac{V_M e_0 \alpha}{2kT})$ .

B Der Dielektrizitätskoeffizient  $\alpha$  zeigt keine Abhängigkeit von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und liegt bei  $\approx 0.22$ .

Abbildung 4.24: Spannungsabhängigkeit der verschobenen Ladung im  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch

Die Ladungsverschiebung nimmt bei depolarisierenden Membranpotentialen ab (A). Die Ladungsverschiebung ist unabhängig von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, wie auch eine Betrachtung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit bei verschiedenen Membranpotentialen in (B) bestätigt.

## 4.4 Transport anderer zweiwertiger Kationen

Der  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher transportiert neben  $\text{Ca}^{2+}$  auch weitere zweiwertige Kationen (Blaustein und Santiago, 1977, Trosper und Philipson, 1983, Kimura et al., 1987, Trac et al., 1997, Condrescu et al., 1997, Egger et al., 1999, Tashiro et al., 2000). Daher war es von Interesse, ob der Transport anderer Kationen einen Einfluss auf die Kinetik des vorstationären Stromsignals hat, der weitere Rückschlüsse auf die zugrunde liegenden Reaktionsschritte erlaubt. Getestet wurde der Einfluss von Strontium und Barium. Hierzu enthielt die extrazelluläre (Pipetten-) Lösung 5 mM  $\text{Sr}^{2+}$  bzw. 5 mM  $\text{Ba}^{2+}$  anstelle von  $\text{Ca}^{2+}$ . Auf der intrazellulären Membranseite wurden wieder  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrations sprünge durch Photolyse von DM-Nitrophen durchgeführt, sodass ein  $\text{Sr}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ - bzw.  $\text{Ba}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch initiiert wurde. Für die Untersuchung eines  $\text{Sr}^{2+}$ - $\text{Sr}^{2+}$ - bzw.  $\text{Ba}^{2+}$ - $\text{Ba}^{2+}$ -Austausches wäre die Beladung des DM-Nitrophen mit  $\text{Sr}^{2+}$  bzw.  $\text{Ba}^{2+}$  notwendig. Da aber zum einen die Bindungskonstanten für  $\text{Sr}^{2+}$  an DMN nicht bekannt sind, zum anderen  $\text{Ba}^{2+}$  deutlich schlechter von DM-Nitrophen gebunden wird als  $\text{Ca}^{2+}$  (Grell et al., 1989), erschien eine Beladung des DM-Nitrophen mit diesen Kationen nicht sinnvoll.

$\text{Sr}^{2+}$  ist bekannt dafür, vom Austauscher ähnlich gut transportiert zu werden wie  $\text{Ca}^{2+}$  (Trosper und Philipson, 1983, Kimura et al., 1987). Dagegen gilt  $\text{Ba}^{2+}$  als schlechtes Substrat, das im Lösungswechselexperiment im Vergleich zu  $\text{Ca}^{2+}$  nur kleine stationäre Ströme im Austausch gegen  $\text{Na}^+$  hervorruft (Trac et al., 1997). Dies ist in Abbildung 4.25

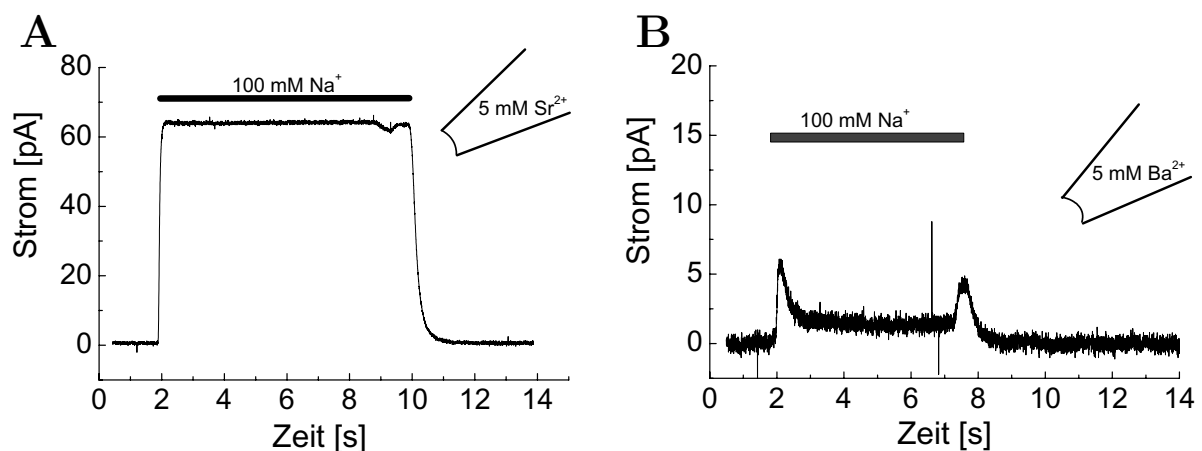


Abbildung 4.25:  $\text{Na}^+$ - $\text{Sr}^{2+}$ - und  $\text{Na}^+$ - $\text{Ba}^{2+}$ -Austausch im Lösungswechselexperiment

Während im  $\text{Sr}^{2+}$ - $\text{Na}^+$ -Austausch (A) hohe stationäre Ströme detektierbar sind, sind die Ströme im  $\text{Ba}^{2+}$ - $\text{Na}^+$ -Austausch (B) nur minimal.

(Die Messungen stammen von zwei verschiedenen Membranflecken aus unterschiedlichen Oozyten. Ein direkter Vergleich beider Signale ist daher nicht möglich. Die transienten Signalanteile in (B) sind Artefakte, bedingt durch Lösungspulse beim Schalten der Ventile.)

dargestellt, wobei ein direkter Vergleich beider Signale allerdings nicht möglich ist, da sie von verschiedenen Membranflecken von unterschiedlichen Oozyten stammen. Das nur wenige Picoampere betragende Stromsignal im  $\text{Ba}^{2+}$ - $\text{Na}^+$ -Austausch ist dabei nicht auf mangelnde Expression des Proteins in der Oozytenmembran zurückzuführen, wie Kontrollmessungen im  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch an Membranpatches, die von der gleichen Oozyte

gewonnen wurden, gezeigt haben. Die Signalhöhe schwankt zwar in der Regel zwischen verschiedenen Membranflecken (auch wenn sie von der gleichen Oozyte stammen), aber sofern die Patches von nahe beieinander liegenden Oberflächenarealen der Oozytenmembran herausgerissen werden, sind starke Abweichungen in der Expressionsdichte des Proteins unwahrscheinlich.

#### 4.4.1 Vorstationäres Stromsignal im $\text{Sr}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch

Da  $\text{Sr}^{2+}$  als gut transportiertes Substrat des Austauschers bekannt ist und auch im Lösungswechselexperiment im  $\text{Na}^{+}$ - $\text{Sr}^{2+}$ -Austausch große, zum  $\text{Na}^{+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch vergleichbare Ströme lieferte, war es nicht verwunderlich, dass sich auch im Photolyseexperiment im  $\text{Sr}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch vergleichbare vorstationäre Stromsignale wie im  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch ergaben.

##### $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit des vorstationären Stromsignals im $\text{Sr}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch

Bei intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprüngen verschiedener Höhe zeigt das vorstationäre Signal im  $\text{Sr}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch das gleiche Verhalten wie im  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch, wie Abbildung 4.26 zeigt: Das Signal nimmt bei abnehmender  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ab und das Abklingen des Signalüberschwingers verlangsamt sich.

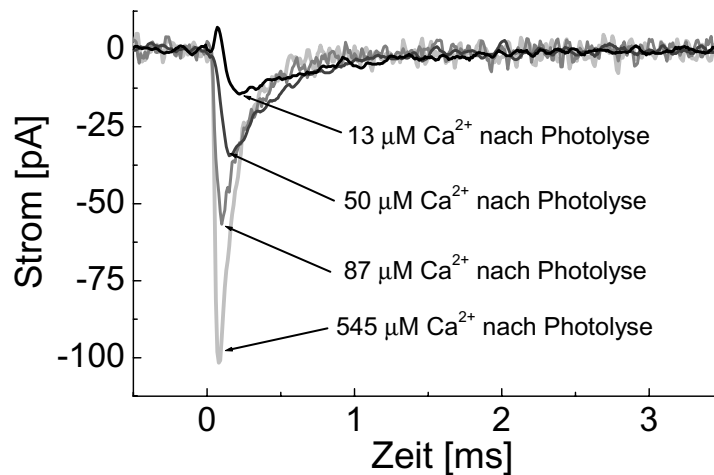


Abbildung 4.26: Vorstationäres Stromsignal bei verschiedenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen im  $\text{Sr}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch

Ebenso sättigt sowohl der Spitzenstrom als auch die Geschwindigkeitskonstante  $1/\tau$  des Signalabfalls bei hohen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen (siehe Abbildung 4.27). Die apparenten  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinitäten von  $K_{M,\text{Spitzenstrom}}^{\text{Ca}^{2+}} = 97 \mu\text{M}$  und  $K_{M,1/\tau}^{\text{Ca}^{2+}} = 138 \mu\text{M}$  dieser Messung liegen zwar höher als die über das transiente Stromsignal im  $\text{Na}^{+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ - bzw.  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch bestimmten  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinitäten, dies liegt aber im Rahmen der Unsicherheit bei der Abschätzung der freigesetzten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration.

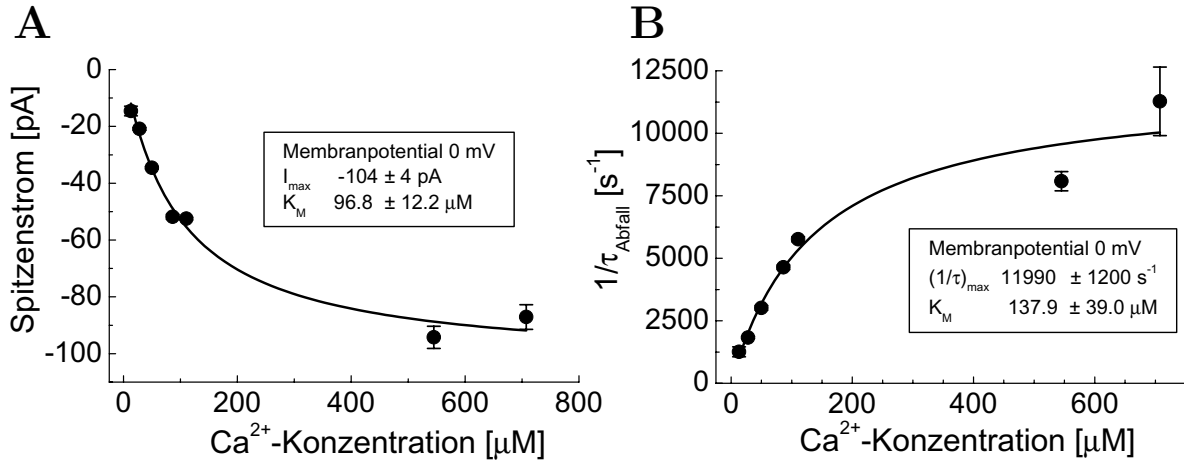


Abbildung 4.27:  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit des Spitzenstroms und der Geschwindigkeitskonstanten im  $\text{Sr}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch

### Spannungsabhängigkeit des vorstationären Stromsignals im $\text{Sr}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch

Wie bei den Messungen zum  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch wurden auch bei den Messungen zum  $\text{Sr}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrations sprünge mit einer Variation des Membranpotentials kombiniert. Das transiente Stromsignal zeigte dabei das gleiche spannungsabhängige Verhalten wie im  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch, sowohl bei hohen als auch bei niedrigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrations sprünge (siehe Abbildung 4.28). Wie beim  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch ist die Geschwindigkeitskonstante  $1/\tau$  des Signalsabfalls unabhängig vom Membranpotential und weist stattdessen nur eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit auf, wie Abbildung 4.29 verdeutlicht.

Auch die apparenten  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinitäten sowohl des Spitzenstroms als auch der Geschwindigkeitskonstanten  $1/\tau_{\text{Abfall}}$  sind spannungsunabhängig im Bereich von -75 bis +75 mV (siehe Abbildung 4.30).

Der Spitzenstrom weist nur eine schwache Spannungsabhängigkeit mit einem  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen Dielektrizitätskoeffizienten  $\alpha \approx 0.25$  (Abbildung 4.31) auf. Die Ladungsverschiebung im  $\text{Sr}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch nimmt bei einer Depolarisation der Membran ab, ist aber von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration unabhängig (Abbildung 4.32).

Insgesamt kann die  $\text{Ca}^{2+}$ - und Spannungsabhängigkeit des vorstationären Stromsignals im  $\text{Sr}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch nach einem photolytischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung als Bestätigung der Ergebnisse aus den Untersuchungen zum  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch gesehen werden.

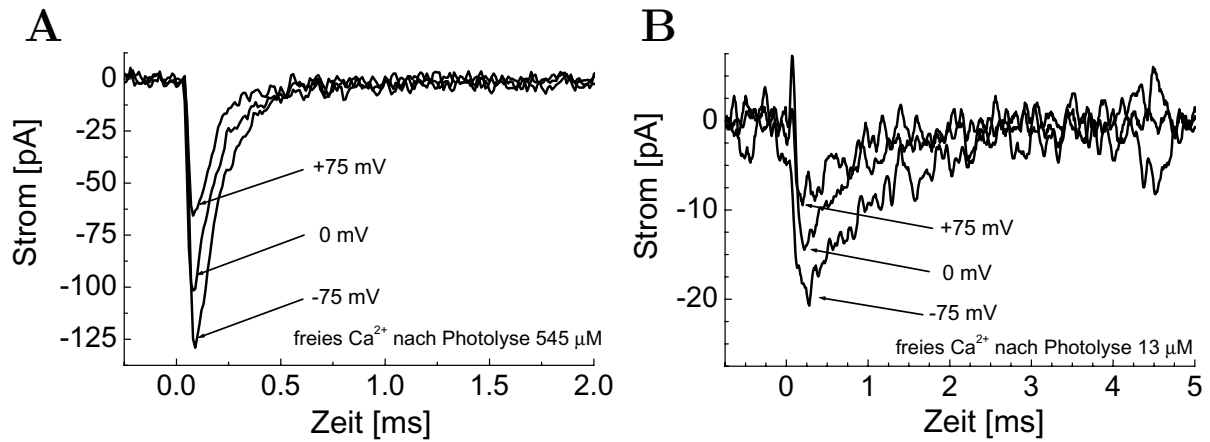


Abbildung 4.28: Spannungsabhängigkeit des  $\text{Sr}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschs

Der transiente Strom im  $\text{Sr}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch zeigt nach einem hohen (A) und einem niedrigen (B)  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung (Laserpuls bei  $t=0$  ms) das gleiche spannungsabhängige Verhalten wie das vorstationäre Stromsignal im  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch.

Die Signale stammen vom gleichen Membranpatch und wurden zur besseren Vergleichbarkeit übereinandergelegt.

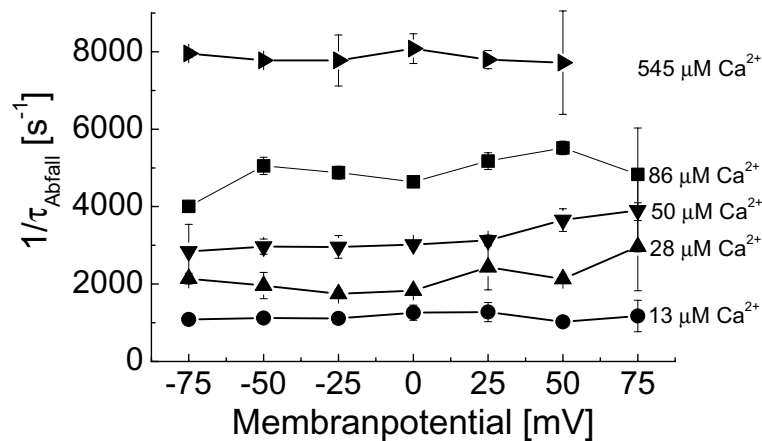


Abbildung 4.29: Spannungsabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten  $1/\tau_{\text{Abfall}}$  bei verschiedenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen im  $\text{Sr}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch

Die Geschwindigkeitskonstante  $1/\tau_{\text{Abfall}}$  des Signalabfalls ist spannungsunabhängig, aber  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig. Alle Daten stammen vom gleichen Membranpatch.

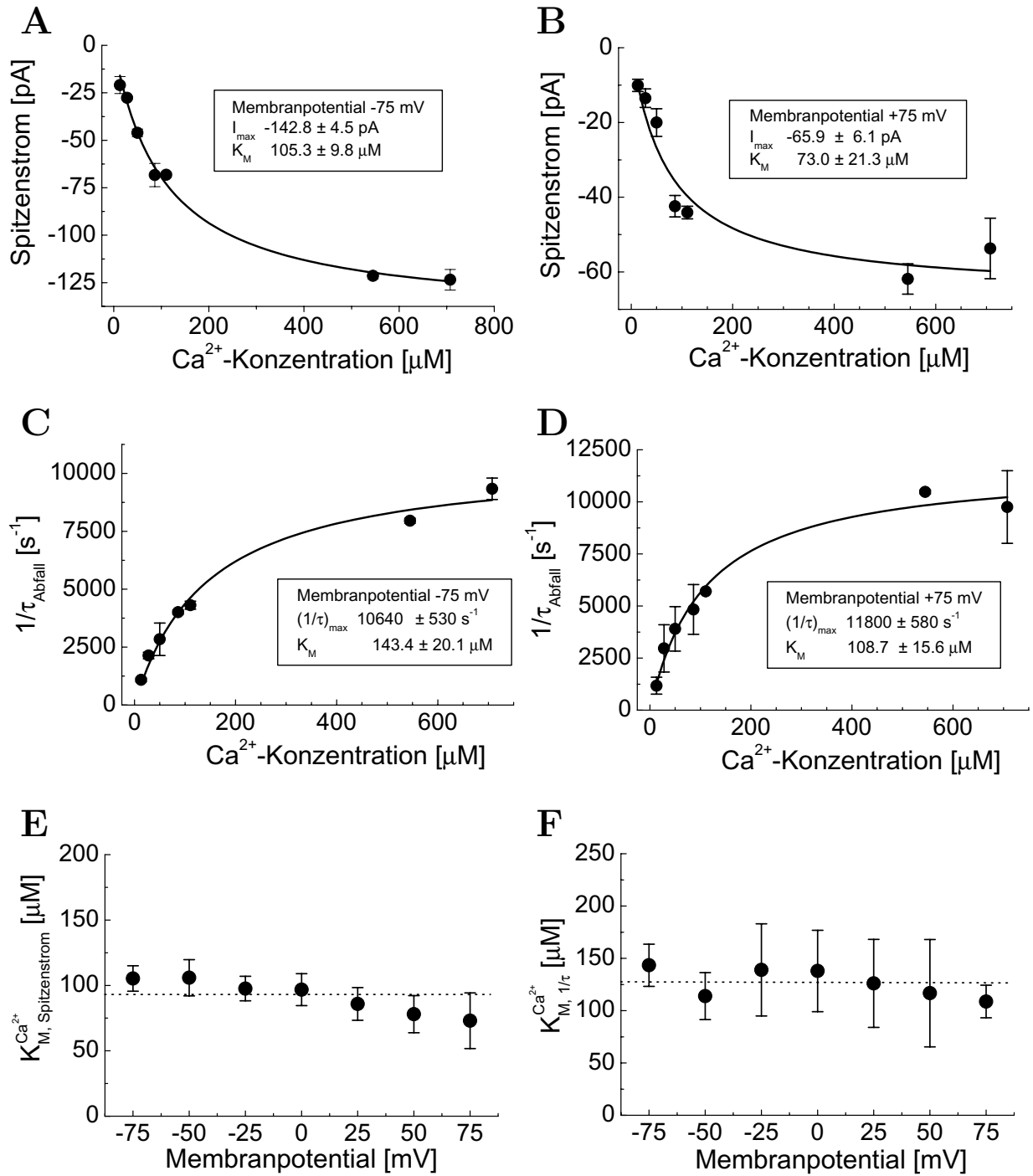
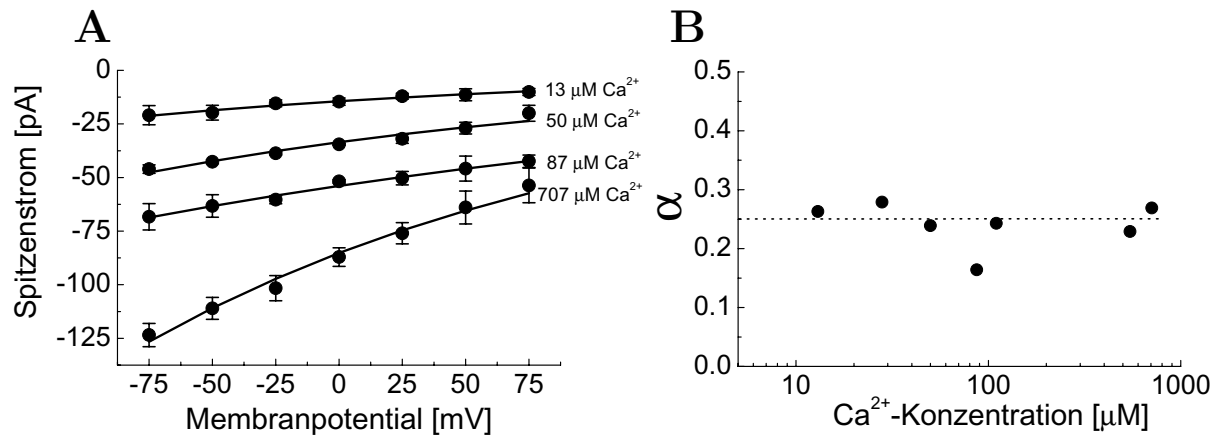
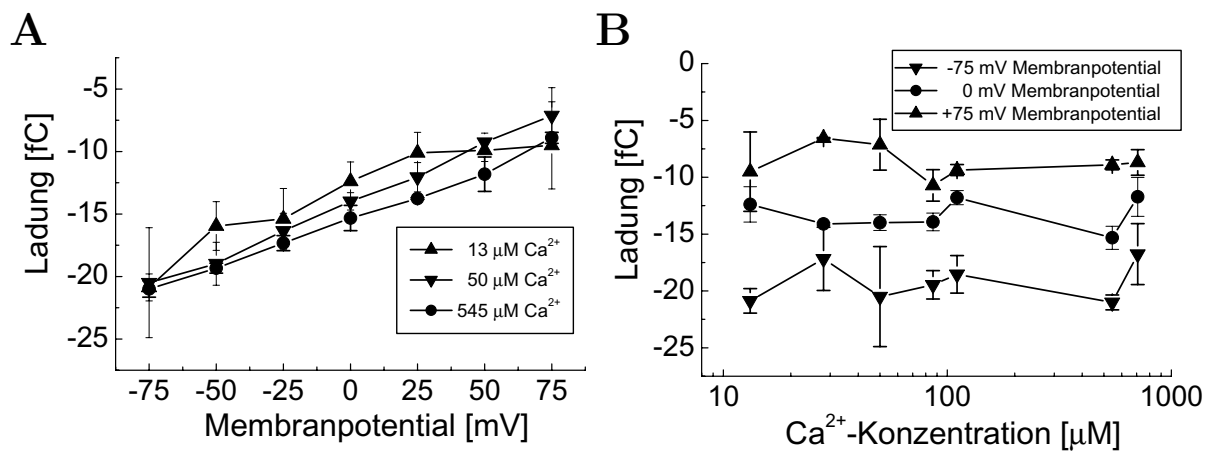


Abbildung 4.30: Spannungsabhängigkeit der apparenten  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinitäten des Spitzenstroms und der Geschwindigkeitskonstanten des Signalabfalls im  $\text{Sr}^{2+}\text{-Ca}^{2+}$ -Austausch

Abbildung 4.31: Spannungsabhängigkeit des Spitzenstroms im  $\text{Sr}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch

Ein Fit der Daten in (A) mit der Funktion  $I = I_0 \cdot \exp(-\frac{V_M e q \alpha}{2kT})$  liefert den Dielektrizitätskoeffizienten  $\alpha$ , der über den gesamten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsbereich bei ca. 0.25 liegt (B).

Abbildung 4.32: Spannungs- und  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der verschobenen Ladung im  $\text{Sr}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch

Die verschobene Ladung (das Integral des transienten Stromsignals) ist spannungs-, aber nicht  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig und zeigt damit das gleiche Verhalten wie im  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch.

#### 4.4.2 Vorstationäres Stromsignal im $\text{Ba}^{2+}\text{-Ca}^{2+}$ -Austausch

Da  $\text{Ba}^{2+}$  im Vergleich zu  $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{Sr}^{2+}$  als vom Austauscher schlecht transportiertes Substrat gilt, war die Frage interessant, ob nach einem photolytischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung ein vorstationäres Stromsignal zu registrieren ist. Überraschenderweise ergab sich sogar ein relativ großes transientes Stromsignal, wie Abbildung 4.33 A zeigt. Der Spitzenstrom von ca. 120 pA liegt im Bereich des Spitzenstroms eines  $\text{Ca}^{2+}\text{-Ca}^{2+}$ -Austausch-Experiments an einem vergleichbaren Membranpatch, obwohl sich im Lösungswechselexperiment bei einem intrazellulären  $\text{Na}^+$ -Sprung (100 mM, 5 mM  $\text{Ba}^{2+}$  extrazellulär) nur ein stationärer Strom  $< 5$  pA ergab. Bei einem photolytischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung an einer Kontrollloozytenmembran war dagegen kein transientes Stromsignal zu verzeichnen, wie Abbildung 4.33 B zeigt.

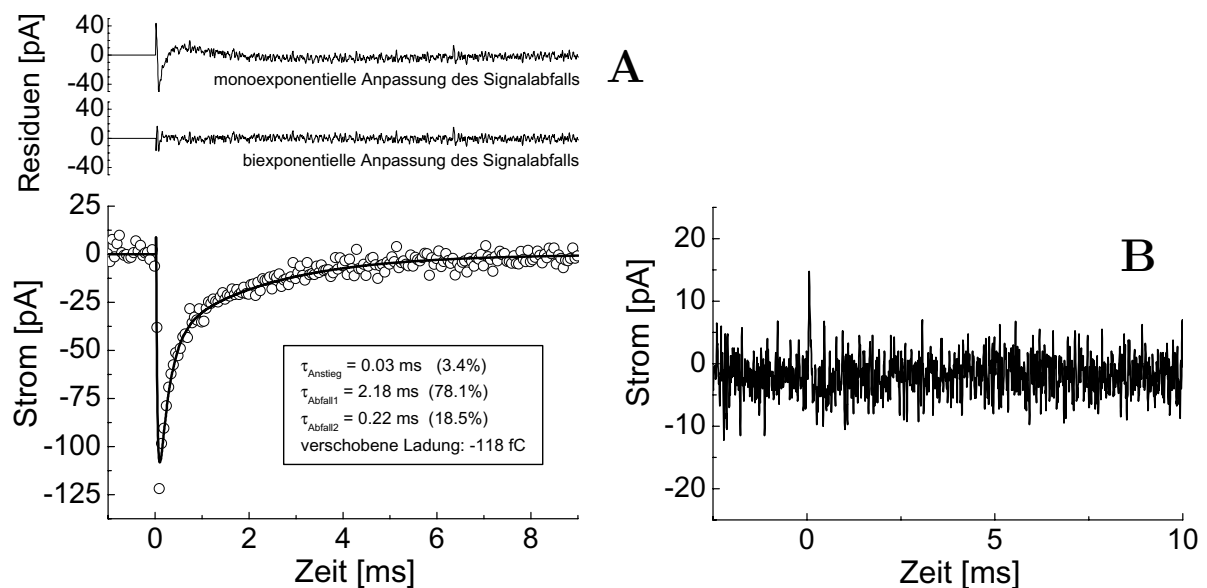


Abbildung 4.33: Vorstationäres Stromsignal im  $\text{Ba}^{2+}\text{-Ca}^{2+}$ -Austausch

A Nach einem intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung auf ca. 100  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  zeigt sich ein transientes Stromsignal, das biphasisch abfällt. Ein biexponentieller Fit des Signalabfalls ergibt die Zeitkonstanten  $\tau_{\text{Abfall1}}=2.18 \text{ ms}$  und  $\tau_{\text{Abfall2}}=0.22 \text{ ms}$  mit 78.15 bzw. 18.5% Anteil am Signal sowie eine Ladungsver-schiebung (Integral des Signals) von -118 fC. Eine monoexponentielle Anpassung des Signalabfalls führt zu einem deutlich schlechteren Ergebnis, wie die Fit-Residuen (oberer Abbildungsteil) verdeutlichen.

B Messung an einer Kontrollloozytenmembran: Nach einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung auf ca. 75  $\mu\text{M}$  ist kein transientes Stromsignal zu verzeichnen.

(5 mM  $\text{Ba}^{2+}$  extrazellulär, DMN-Konzentration 1000  $\mu\text{M}$  (A) bzw. 600  $\mu\text{M}$  (B), Membranpotential 0 mV, Laserpuls bei  $t=0 \text{ ms}$ , Filterbandbreite 10 kHz)

Auffallend ist das biphasische Abklingen des transienten Signals in Abbildung 4.33A. Eine Anpassung des Signalabfalls mit einer monoexponentiellen Funktion liefert nur ein schlechtes Resultat, wie die Residuen verdeutlichen. Eine zweite Phase im Signalabfall konnte bei den Messungen im  $\text{Ca}^{2+}\text{-Ca}^{2+}$ -Austausch (mit 5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  extrazellulär) und  $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ -Austausch (mit 100 mM  $\text{Na}^+$  extrazellulär) bisher nicht beobachtet werden (siehe aber unten, Abschnitt 4.4.3). Eine Anpassung des Signals mit drei Exponential-



funktionen ergibt für den Signalanstieg eine Zeitkonstante von  $\tau=0.03$  ms und für den Signalabfall die Zeitkonstanten  $\tau_{Abfall1}=2.18$  ms bzw.  $\tau_{Abfall2}=0.22$  ms. Die Zeitkonstante der schnellen Phase des Signals liegt damit im Bereich der aus dem  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch bekannten Zeitkonstanten für den Signalabfall. Die zusätzliche langsame Phase repräsentiert möglicherweise einen Reaktionsschritt, der durch die Verwendung von  $\text{Ba}^{2+}$  nun erstmals sichtbar gemacht werden konnte.

Auffallend ist zudem die mit dem transienten Stromsignal verbundene hohe Ladungsverschiebung von -118 fC, die erheblich größer ist als die im  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ - oder  $\text{Sr}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Modus beobachtete Ladungsverschiebung (vgl. vorherige Abschnitte, siehe auch Kappl et al., 2001). Die zusätzliche langsame Phase im Signal (bei vergleichbarer Höhe des Spitzenstroms im  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch) führt zu einer deutlich größeren Fläche unter dem Signal: Die verschobene Ladung (Absolutwert) ist im gezeigten Beispielsignal mit  $> 100$  fC bei 0 mV merklich größer als im  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch ( $\Delta Q$  typischerweise  $\approx 25$  fC, Vergleich der Absolutwerte, tatsächlich werden negative Ladungen verschoben). Das heißt, mit dem in der langsamen Phase beobachteten zusätzlichen Reaktionsschritt muss eine hohe Ladungstranslokation verbunden sein, die in dieser Form im  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch bisher noch nicht gesehen wurde.

Eine t-Test-Analyse bestätigt dies: Das Integral (und damit die verschobene Ladung) eines auf einen Spitzenstrom von -100 pA normierten Signals ist im  $\text{Ba}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch signifikant größer als das eines Signals im  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch (-64.8 vs. -29.4 fC, Signifikanzniveau  $\alpha=0.05$ , siehe Tabelle 4.3).

Transportmodus	mittlere Ladungsverschiebung	Varianz $\sigma$	Anzahl	Ergebnis t-Test
$\text{Ba}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch	-64.8 fC	86.2	n=5	t=6.338
$\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch	-29.4 fC	83.9	n=6	p=1.35·10 <sup>-4</sup>

Tabelle 4.3: t-Test-Analyse der mittleren Ladungsverschiebung im  $\text{Ba}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch

Bei einem Signifikanzniveau von  $\alpha=0.05$  ist die Ladungsverschiebung im  $\text{Ba}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch eindeutig größer als im  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch. Zur Ermittlung der Ladungsverschiebung der ausgewählten Einzelmessungen wurden diese zuvor auf einen Spitzenstrom von -100 pA normiert.

### **Einfluss des freien $\text{Ca}^{2+}$ in der DM-Nitrophenlösung auf die Spannungsabhängigkeit des vorstationären Stromsignals**

Das vorstationäre Signal im  $\text{Ba}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch zeigt neben dem biphasischem Signalabfall auch in der Spannungsabhängigkeit Abweichungen vom  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch, wie Abbildung 4.34 A-F verdeutlicht: Der Spitzenstrom nimmt nur minimal bei depolarisierenden Membranpotentialen ab (Abb. 4.34 A), sodass die verschobene Ladung im betrachteten Spannungsbereich von -75 bis +75 mV nahezu konstant bleibt (E).

Eine genauere Untersuchung zeigt, dass die Ladungsverschiebung von der freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration vor der Freisetzung abhängt: Eine Erhöhung der intrazellulären freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (das heißt, in der DM-Nitrophenlösung) vor der Photolyse auf  $>1 \mu\text{M}$ ,

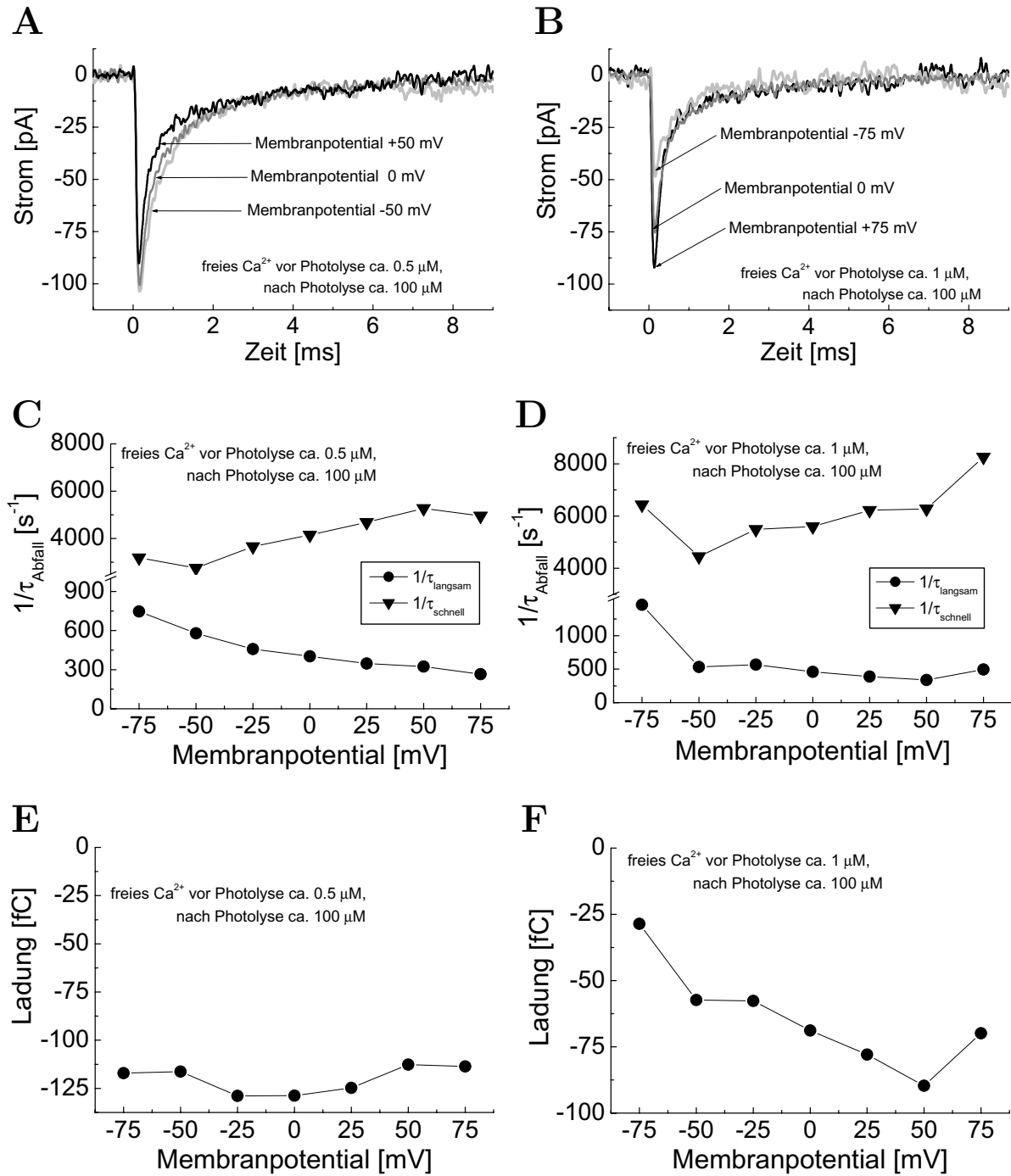


Abbildung 4.34: Spannungsabhängigkeit des vorstationären Stromsignals im  $\text{Ba}^{2+}\text{-Ca}^{2+}$ -Austausch bei zwei verschiedenen freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen vor der Photolyse. Eine Erhöhung der freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der DM-Nitrophen-Lösung führt zu einer Umkehr der Spannungsabhängigkeit der Ladungverschiebung im Vergleich zum  $\text{Ca}^{2+}\text{-Ca}^{2+}$ -Austausch. Eine Spannungsabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten  $1/\tau_{\text{Abfall1}}$  und  $1/\tau_{\text{Abfall2}}$  ist nicht eindeutig. Auffallend ist die deutlich höhere Ladungverschiebung im  $\text{Ba}^{2+}\text{-Ca}^{2+}$ -Austausch (E und F) im Vergleich zum  $\text{Ca}^{2+}\text{-Ca}^{2+}$ -Austausch.

(A,C,E: freies  $\text{Ca}^{2+}$  in der DM-Nitrophen-Lösung vor der Photolyse  $\leq 0.5 \mu\text{M}$ , B,D,F: freies  $\text{Ca}^{2+} \geq 1 \mu\text{M}$ )

kann die Spannungsabhängigkeit der Ladungsverschiebung im Vergleich zum  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch sogar umkehren. Bei Depolarisation zeigt sich nun eine Zunahme des Spitzenstroms (Abb. 4.34 B), was in einer deutlichen Zunahme der verschobenen Ladung resultiert (F). Eine Änderung der Anfangszustandsverteilung vor dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung scheint die Spannungsabhängigkeit des transienten Stromsignals im  $\text{Ba}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch also deutlich beeinflussen zu können.

Eine Untersuchung der Spannungsabhängigkeit des Signalabfalls konnte dagegen kein eindeutiges Ergebnis liefern: Zwar scheinen die Geschwindigkeitskonstanten  $1/\tau_{\text{Abfall1}}$  und  $1/\tau_{\text{Abfall2}}$  der in Abbildung 4.34 C und D gezeigten Messung an einem exemplarischen Membranpatch eine leichte, entgegengesetzte Spannungsabhängigkeit aufzuweisen, allerdings gelang die Messung der Spannungsabhängigkeit nur an zwei Membranflecken. Da die Spannungsabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten nur sehr schwach ausgeprägt ist, sind hier weitere Untersuchungen notwendig.

#### 4.4.3 Kontrollmessungen bei niedrigen extrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen

Da die Verwendung von extrazellulärem  $\text{Ba}^{2+}$  anstelle von  $\text{Ca}^{2+}$  zum Auftreten einer zweiten, langsamen Phase im Signalabfall des vorstationären Stroms führte, sollte getestet werden, ob dieser Effekt möglicherweise mit einer deutlich verringerten Affinität des Austauschers für  $\text{Ba}^{2+}$  im Vergleich zu  $\text{Ca}^{2+}$  zu erklären ist. In diesem Fall wären 5 mM extrazelluläres  $\text{Ba}^{2+}$  eventuell nicht ausreichend, um eine zum  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch vergleichbare Zustandsverteilung vor dem intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung durch Photolyse einzustellen. Umgekehrt sollte sich dann durch eine Verringerung der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf subsättigende Werte im  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch eine zum  $\text{Ba}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch vergleichbare Situation einstellen lassen. Daher wurden Kontrollexperimente mit 500 bzw. 100  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  statt wie bisher 5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  in der Pipettenlösung durchgeführt.

Abbildung 4.35 zeigt das vorstationäre Stromsignal nach einem intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung auf ca. 100  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  (freies  $\text{Ca}^{2+}$  vor Photolyse ca. 0.5  $\mu\text{M}$ ) bei 500 (A) bzw. 100  $\mu\text{M}$  (B) extrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration: Beide Signale fallen biexponentiell mit einer schnellen und einer langsamen Phase ab. Die Zeitkonstante der schnellen Phase liegt zwischen 0.1 und 0.2 ms und damit im Bereich der vom  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch hinlänglich bekannten Werte. Die langsame Phase liegt bei ca. 1 bzw. 1.3 ms und ist damit deutlich größer als die schnelle Phase, liegt aber noch unter den Werten der langsamen Phase im  $\text{Ba}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch von ca. 2 ms. Die Ladungsverschiebung beträgt -30 fC (A, 500  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  extrazellulär) bzw. -107 fC (B, 100  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  extrazellulär). Normiert man diese Wert auf einen Spitzenstrom von -100 pA, so ergibt sich eine normierte Ladungsverschiebung von -46 bzw. -49 fC. Vergleicht man diese Werte mit denen aus Tabelle 4.3 (t-Test für Ladungsverschiebung im  $\text{Ba}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch, Seite 95), so liegt die Ladungsverschiebung auch bei Verwendung einer subsättigenden extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration über der im  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch bei einer sättigenden extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 5 mM. Die Größe der Ladungsverschiebung

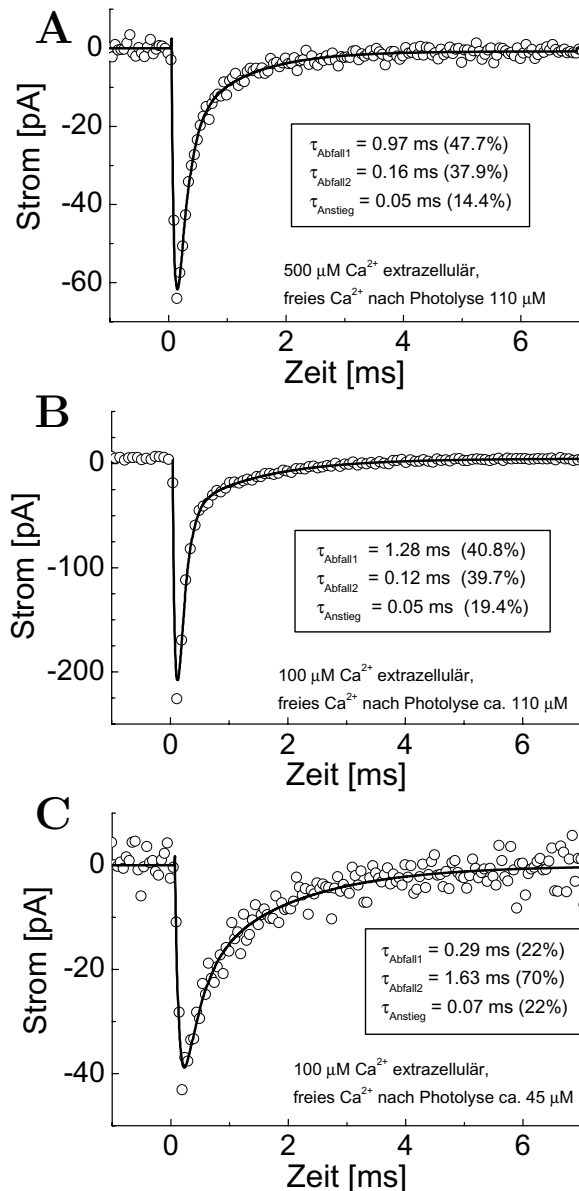


Abbildung 4.35: Einfluss der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf das vorstationäre Stromsignal im  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch

Eine Verringerung der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf 500 (A) bzw. 100  $\mu\text{M}$  (B und C) führt zu einem biphasischen Signalabfall nach einem intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung im  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch, der vergleichbar zu den Resultaten im  $\text{Ba}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch ist.

(Fitparameter siehe in Abbildung, Ladungsverschiebung: -30 fC (A), -107 fC (B) bzw. -46 fC (C), freies  $\text{Ca}^{2+}$  vor Photolyse  $\leq 500 \text{ nm}$ , nach Photolyse ca. 100  $\mu\text{M}$  (A und B) bzw. ca. 45  $\mu\text{M}$  (C). Die Pipettenlösungen in (A) und (B) enthielten zusätzlich 5 bzw. 10 mM  $\text{Mg}^{2+}$ , da sich sonst ein Gigaohmseal nicht etablieren ließ. Eine biexponentieller Abfall konnte aber auch bei Verwendung einer  $\text{Mg}^{2+}$ -freien Pipettenlösung (C) beobachtet werden.)

im  $\text{Ba}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch wird allerdings noch nicht ganz erreicht.

Danach ließe sich alleine durch eine Verringerung der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration eine zum  $\text{Ba}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch vergleichbare Situation einstellen. Allerdings bleibt anzumerken, dass es notwendig war,  $\text{Mg}^{2+}$  der Pipettenlösung hinzuzufügen, da sich sonst, bedingt durch eine schlechtere Qualität der Oozyten, keine stabilen Gigaohmabdichtwiderstände erzielen ließen. Nur unter Verwendung von Patchpipetten mit kleinerem Öffnungsdurchmesser und Photolyse bei relativ niedriger Laserpulsenergie (Umsatz nur ca. 5%) gelang eine erfolgreiche Messung bei einer extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  ohne  $\text{Mg}^{2+}$  (siehe Abb. 4.35C). Diese scheint das biexponentielle Signalabklingen zu bestätigen (Zeitkonstanten für den Signalabfall:  $\tau_{\text{Abfall1}}=0.29 \text{ ms}$ ,  $\tau_{\text{Abfall2}}=1.63 \text{ ms}$ , Ladungsverschiebung -46 fC), allerdings bei einem schlechteren Signal-Rausch-Verhältnis und der möglichen Ausbildung eines  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrations„spikes“ durch einen Photolyseumsatz  $< 10\%$ . Da neuere Veröffentlichungen aber auf einen  $\text{Mg}^{2+}$ -Transport durch den Austauscher hindeuten (Tashiro et al., 2000), ist nicht auszuschließen, dass das  $\text{Mg}^{2+}$  die

in (A) und (B) gezeigten Messungen dennoch beeinflusst haben könnte. Man kann aber festhalten, dass die Wahl des extrazellulären zweiwertigen Kations und dessen Konzentration einen deutlichen Einfluss auf die Kinetik des vorstationären Stromsignals hat und sich damit weitere Information auf die zugrunde liegenden Reaktionsschritte gewinnen lassen (siehe Diskussion).

## 4.5 Spannungssprungexperimente im $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch

Neben den Konzentrationssprungexperimenten bieten Spannungssprungexperimente, wie bereits erwähnt und bei den Messungen an den  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanälen angewandt, eine weitere Möglichkeit zur Messung von Vergleichgewichtsströmen. Spannungssprungexperimente im  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch wurden bereits von D. Hilgemann durchgeführt (Hilgemann, 1996). Er hat dabei Geschwindigkeitskonstanten bestimmt, die in der Größenordnung mit den aus den photolytischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationssprungexperimenten ermittelten übereinstimmen, aber abweichend von diesen eine Spannungsabhängigkeit aufweisen.

Hilgemann hat mittels eines modifizierten Patch-Clamp-Verstärkers direkt die Ladungsverschiebung gemessen. Das von Hilgemann verwendete Messsystem hatte eine sehr hohe Bandbreite von 1 Megahertz. Da der Austauscher bei den Konzentrationssprungexperimenten in der vorliegenden Arbeit zwar eine sehr schnelle Kinetik gezeigt hat, die vorstationären Ströme aber sehr gut bei einer Filterbandbreite von 10 kHz mit einem nicht-modifizierten Verstärker aufgezeichnet werden konnten, sollte eine Bandbreite von 1 MHz bei Spannungssprungexperimenten nicht notwendig sein. Hierfür spricht auch die Tatsache, dass die von Hilgemann (1996) gemessenen Geschwindigkeitskonstanten unter  $10^4 \text{ s}^{-1}$  liegen. Auf die Verwendung eines modifizierten Verstärkers zur Reproduzierung der Daten Hilgemanns wurde daher verzichtet.

Das verwendete Spannungsprotokoll ist in Abbildung 4.36A dargestellt: Für 2 ms wird das Haltepotential zwischen -200 und +200 mV variiert. Länger andauernde Spannungssprünge führen zu Instabilitäten des Abdichtwiderstandes. Da sich durch die hohe Filterbandbreite und die extremen Haltepotentiale von  $\pm 200 \text{ mV}$  sehr große kapazitive Stromtransienten ergeben, die zu einer Übersteuerung des Verstärkers führen würden, wird 40  $\mu\text{s}$  vor dem Spannungssprung bzw. dem Rücksprung auf 0 mV der *forced reset* des Verstärkers geschaltet. Dadurch kann für die Messungen ein höherer Verstärkungsfaktor gewählt werden, ohne dass der Verstärker gesättigt wird. Zudem wird die Kapazitätskompensation des Verstärkers genutzt, um alle Störkapazitäten so weit wie möglich auszugleichen.

Die Spannungssprungexperimente werden zum einen in Gegenwart von intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  (extrazellulär 5 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ), zum anderen in Abwesenheit von intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  durchgeführt und von diesen Signalen dann das Differenzstromsignal bestimmt (siehe Abbildung 4.36 B bis E). Der Signalabfall des resultierenden transienten Stromsignals, das dann auf Ladungsverschiebungen durch den Austauscher zurückzuführen sein sollte,

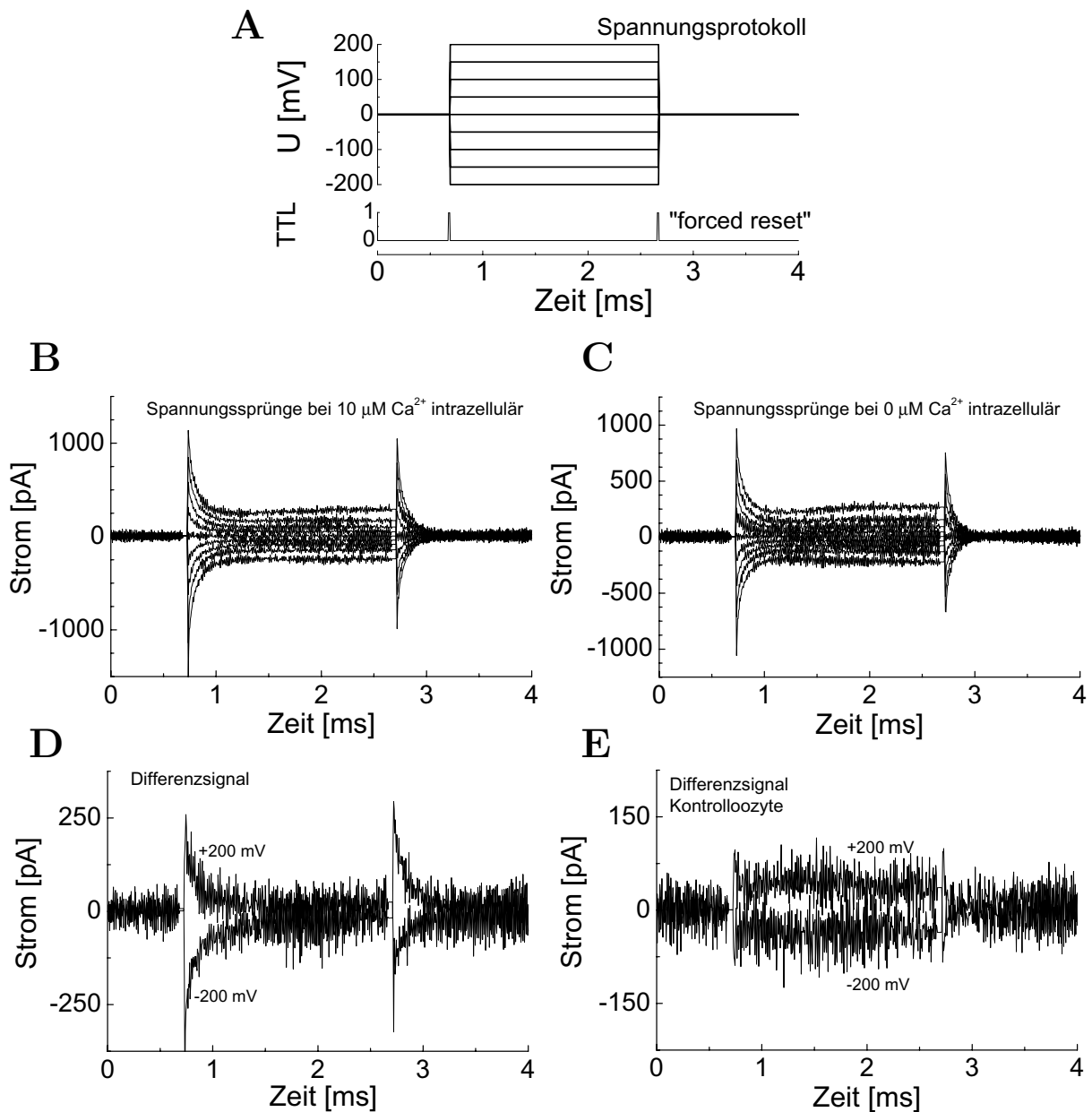


Abbildung 4.36: Spannungssprungexperiment im  $\text{Ca}^{2+}\text{-Ca}^{2+}$ -Austausch

A Spannungsprotokoll

B typisches Stromsignal in Gegenwart von intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  und

C in Abwesenheit von intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$

D ideales Differenzsignal aus B minus C, gemessen an einem Membranpatch von einer den Austauscher exprimierenden Oozyte

E ideales Differenzsignal einer Messung an einem Membranpatch von einer Kontrollloozyte

(5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  extrazellulär, Filterbandbreite 100 kHz)

wird mit einer Exponentialfunktion angepasst.

Die Ergebnisse dieser Messungen sind widersprüchlich wie ausgewählte Messungen in Abbildung 4.37 A und B verdeutlichen: Zum Teil konnte eine leichte Spannungsabhängigkeit bei niedrigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen (5 bzw. 10  $\mu\text{M}$ ) gemessen werden (Abb. 4.37 B), die allerdings nur sehr schwach ausgeprägt ist, wie eine Anpassung mit der Gleichung  $1/\tau = k_0 \cdot \exp\left(-\frac{\alpha U_m e_0}{2kT}\right)$  zeigt:  $\alpha$  liegt nur bei 0.11 bzw. 0.10. Die Daten aus Messungen an anderen Membranpatches zeigten dagegen z.T. keine Spannungsabhängigkeit (Abb. 4.37 A). Zudem konnten in einigen Fällen auch an Membranen von Kontrollen (nicht den Austauscher exprimierende Oozyten) bei hohen intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen (100  $\mu\text{M}$ ) transiente Ströme im Differenzsignal gesehen werden. Diese widersprüchlichen Messungen konnten an mehreren Membranpatches aus verschiedenen Oozytenchargen bestätigt werden, sodass sich aus den Ergebnissen nicht gesichert auf eine Spannungsabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten schließen lässt. Die Ursache für diese Nichtreproduzierbarkeit der Messergebnisse Hilgemanns ist unklar. Unzureichende Gigaohmabdichtwiderstände können als Ursache im wesentlichen ausgeschlossen werden. Allerdings war das schlechte Signal-Rauschverhältnis (siehe Abb. 4.36D) problematisch: Auswertbare Differenzsignale konnten in der Regel nur nach Mittelung mehrerer Einzelmessungen am gleichen Membranpatch erreicht werden. Kurzzeitige Schwankungen in der Sealstabilität könnten dann das gemittelte Signal negativ beeinflusst haben. Hier liegt möglicherweise ein Vorteil der direkten Ladungsmessung mit einem modifizierten Verstärker, wie Hilgemann ihn verwendet hat: Durch ein besseres Signalrauschverhältnis des Einzelsignals wäre eine Mitteilung mehrerer Signale nicht notwendig.

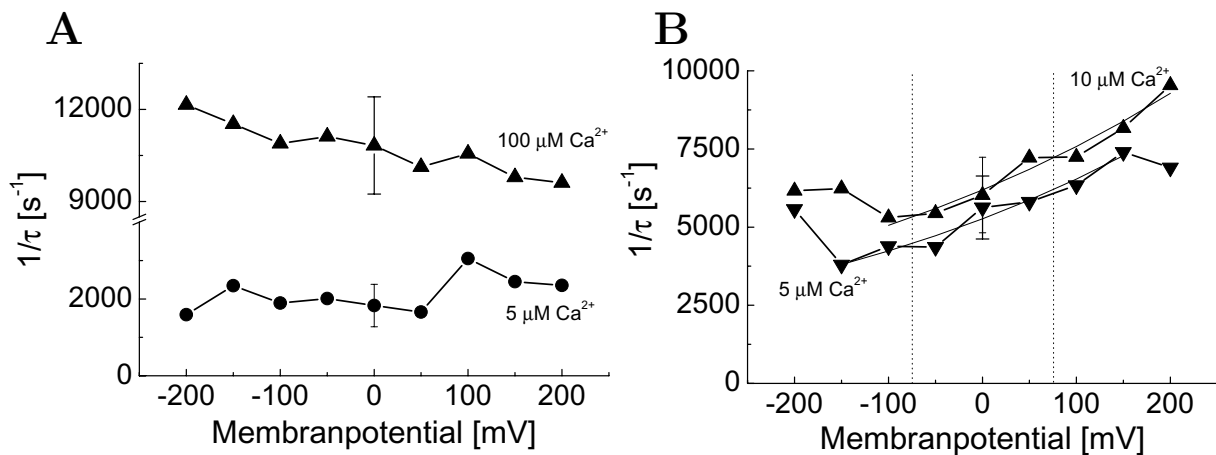


Abbildung 4.37: Spannungsabhängigkeit der im Spannungssprungexperiment bestimmten Geschwindigkeitskonstanten

Die Daten in A und B (gemessen an zwei verschiedenen den Austauscher exprimierenden Membranflecken) sind widersprüchlich: Eine Spannungsabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten kann nicht eindeutig bestätigt werden.

In (B) wurden die Daten zusätzlich mit der Gleichung  $1/\tau = k_0 \cdot \exp\left(-\frac{\alpha U_m e_0}{2kT}\right)$  angepasst. Es ergaben sich als Fitparameter für  $k_0$  5260 bzw. 6190  $\text{s}^{-1}$  und für  $\alpha$  0.11 bzw. 0.10. Die Spannungsabhängigkeit wäre damit nur sehr schwach ausgeprägt. (Fehlerbalken:  $\bar{x} \pm SD$  für Geschwindigkeitskonstanten beim Rücksprung auf 0 mV,  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration extrazellulär 5 mM, intrazellulär siehe in Abbildung)

# Kapitel 5

## Diskussion

### 5.1 Der endogene $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte Chloridkanal der *Xenopus* Oozytenmembran

Die Untersuchungen am endogenen  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanal mittels Photolyse von *caged-Calcium* und der Makropatch-Technik in der *inside-out*-Konfiguration haben die Vorteile dieser Messtechnik verdeutlicht: Durch den sehr schnellen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung konnten vorstationäre Ströme in hoher Zeitauflösung registriert werden, die Rückschlüsse auf den zugrunde liegenden Öffnungsmechanismus ermöglichen. Ebenso haben die Spannungssprungexperimente in hoher Zeitauflösung weitere Einblicke in die Kinetik des  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanals gebracht. Im folgenden soll nun aus den im Kapitel 3 gewonnenen Ergebnissen ein Reaktionsmodell für den  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanal aufgestellt und die Resultate im Vergleich mit Literaturdaten diskutiert werden.

#### 5.1.1 Vergleich der Ergebnisse mit Literaturdaten

##### $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprungexperimente am $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanal

$\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationssprünge wurden zum einen im Lösungswechselexperiment, zum anderen schwerpunktmäßig im Photolyseexperiment durchgeführt. Als wichtiges Ergebnis der Lösungswechselexperimente für die weitere Interpretation hat sich herausgestellt, dass sich die  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit des stationären Chloridstroms bei 0 mV Membranpotential mit einer Hill-Funktion mit einem Hill-Koeffizienten von  $n = 1.98 \pm 0.12$  anpassen lässt. Die apparente  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität lag dabei bei  $0.50 \pm 0.02 \mu\text{M}$ . Ähnliche Ergebnisse wurden bereits für  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte Chloridkanäle in anderen Zelltypen gefunden (Evans und Marty, 1986, Koumi et al., 1994). Für die  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanäle in der *Xenopus* Oozytenmembran haben Qu und Hartzell (2000) eine apparente  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität zwischen 100 nM bei -150 mV und 450 nM bei +100 mV gemessen. Der Hill-Koeffizient wurde von Kuruma und Hartzell (2000) zu  $n=3.2$  (bei -120 mV) bzw.  $n=2.5$  (bei +120 mV), ebenfalls bei Messungen an Oozytenmembranpatches, bestimmt. Diese leichten Abweichungen zu den eigenen Ergebnissen lassen sich zum einen mit der oftmals problematischen Einstellung der freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in den Lösungen erklären. Zum anderen stellt der



auch von Hartzell und Mitarbeitern bestätigte starke Signal-Rundown bei Messungen am *excised*-Patch ein Problem dar, der die Bestimmung der apparenten  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität und des Hill-Koeffizienten beeinflusst. Man kann aber gesichert davon ausgehen, dass der Hill-Koeffizient mindestens  $n = 2$  beträgt. Dies deutet darauf hin, dass mindestens zwei  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen an den Kanal binden. Dies ist für die Interpretation der weiteren Ergebnisse festzuhalten.

Als ein wichtiges Resultat der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprungexperimente mittels Photolyse von DM-Nitrophen hat sich das Auftreten einer Verzögerungsphase („lag phase“) vor dem eigentlichen Signalanstieg erwiesen. Die Lagphase, die deutlich kürzer als der Signalanstieg ist, konnte mit schnellen Lösungswechselsystemen bisher nicht detektiert werden, da deren Zeitauflösung nicht ausreicht. Sowohl die Lagphase als auch der Signalanstieg haben nur eine schwache Spannungsabhängigkeit, aber eine starke  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit gezeigt.

Kuruma und Hartzell (2000) haben im Lösungswechselexperiment (Zeitauflösung laut Kuruma und Hartzell  $< 5$  ms) auch eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit des Signalanstiegs nach einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung bestimmt. Der Signalanstieg hat bei hohen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen keine Spannungsabhängigkeit gezeigt. Lediglich bei niedrigen, nichtsättigenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen konnten Kuruma und Hartzell eine leichte Spannungsabhängigkeit messen. Die von Kuruma und Hartzell gezeigten Daten lassen insgesamt aber eher auf eine Spannungsunabhängigkeit auch bei niedrigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen schließen, sodass deren Ergebnisse mit der im Rahmen dieser Arbeit gefundenen, nur schwach ausgeprägten Spannungsabhängigkeit des Signalanstiegs übereinstimmen.

Allerdings liegen die von Kuruma und Hartzell angegebenen Zeitkonstanten für den Signalanstieg insbesondere bei nichtsättigenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen z.T. um eine Größenordnung über den mittels Photolyse gemessenen Zeitkonstanten. Lediglich bei hohen, sättigenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen liegt die von Kuruma und Hartzell bestimmte Zeitkonstante für den Signalanstieg im Bereich weniger Millisekunden und stimmt mit den in den Photolysemessungen ermittelten Werten überein. Dies könnte auf eine unzureichenden Zeitauflösung des Lösungswechselsystems zurückzuführen sein, da nur bei supersättigenden Konzentrationen keine Diffusionslimitierung vorliegt. Bei niedrigen, subsättigenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprüngen ist ein Lösungswechsel dagegen meist zu langsam.

Als wahrscheinlichere Ursache für die starke Diskrepanz in den Messungen kommt in diesem Fall allerdings die Verwendung von 4 mM  $\text{Mg}^{2+}$  in den Badlösungen bei Kuruma und Hartzell in Betracht. Dies räumen Qu und Hartzell (2000) als Erklärung für eine später gemessene deutlich höhere  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität (279 nM vs. 2.2  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  bei 0 mV im Vergleich zu Kuruma und Hartzell (2000)) ein.  $\text{Mg}^{2+}$  hemmt wahrscheinlich den Kanal kompetitiv zu  $\text{Ca}^{2+}$ . Bei den Messungen mit DM-Nitrophen musste dagegen von vorneherein auf  $\text{Mg}^{2+}$  in den Lösungen verzichtet werden, da DM-Nitrophen ebenfalls  $\text{Mg}^{2+}$  bindet und so die Photolysemessungen beeinflusst hätte. In der Folgepublikation haben Qu und Hartzell leider die  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit des Signalanstiegs nicht wiederholt, so dass kein direkter Vergleich der Zeitkonstanten mit den eigenen Werten möglich ist.

Für sättigende  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen haben Gomez-Hernandez et al. (1997), ebenfalls mit einem Lösungswechselsystem gemessen, eine spannungsunabhängige Zeitkonstante

von 4 ms für den Signalanstieg nach einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung gefunden. Diese Resultate stimmen damit gut mit den Ergebnissen aus den Photolysemessungen überein. Gomez-Hernandez et al. haben allerdings keine vollständige  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsabhängigkeit durchgeführt.

Über die in dieser Arbeit gezeigte  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit des Signalanstiegs hinaus, haben Kuruma und Hartzell auch das zeitliche Verhalten beim Auswaschen von  $\text{Ca}^{2+}$  untersucht. Der Signalabfall bei  $\text{Ca}^{2+}$ -Wegnahme ist danach nahezu unabhängig von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, aber spannungsabhängig: Bei Depolarisation der Membran wurde der Signalabfall langsamer ( $\tau_{\text{deakt.}} \approx 100 - 200$  ms bei -100 mV,  $\tau_{\text{deakt.}} \approx 150 - 600$  ms bei 0 mV, abhängig von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration). Ähnliche Resultate bei Wegnahme einer sättigenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration haben auch Gomez-Hernandez et al. gefunden. Solche  $\text{Ca}^{2+}$ -Wegnahme-Versuche sind mit der in dieser Arbeit verwendeten Photolysemethode nicht ohne weiteres möglich, so dass die Resultate Kuruma und Hartzells nicht quantitativ verifiziert werden konnten. Dennoch sollte ein später vorgeschlagenes Gating-Modell deren Resultate zumindest qualitativ widerspiegeln.

Die Spannungsabhängigkeit des stationären Chloridstroms nach einem sättigenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung mittels Photolyse hat eine leichte Einwärtsgleichrichtung der Strom-Spannungskennlinie bei stark depolarisierenden Membranpotentialen ergeben. Eine solche Gleichrichtung bei sättigender  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ist ebenfalls deutlich bei Gomez-Hernandez et al. und auch (allerdings weniger stark ausgeprägt, da nur bei 2  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  gemessen) bei Kuruma und Hartzell in den Strom-Spannungskennlinien zu sehen. Beide Arbeitsgruppen gehen auf diese Gleichrichtung bei depolarisierenden Membranpotentialen in ihren Veröffentlichungen leider nicht weiter ein. Die hier vorgelegten Ergebnisse deuten aber auf eine teilweise Inaktivierung des  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanals bei starker Depolarisation der Membran hin, die sich dann in der Gleichrichtung der Strom-Spannungskennlinie widerspiegelt.

### Spannungssprungexperimente am $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanal

Die typische langsame Aktivierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanäle nach einem depolarisierenden Spannungssprung, wie sie im Experimententeil gezeigt worden sind, wurden in der Literatur zahlreich, hauptsächlich bei Untersuchungen an anderen Zelltypen, beschrieben (Marty et al., 1984, Evans und Marty, 1986, Ishikawa und Cook, 1993, Arreola et al., 1996, Ishikawa, 1996, Nilius et al., 1997, Kidd und Thorn, 2001, Papassotirou et al., 2001). Diese langsame Aktivierung konnte erstmals von M. Barish (1982) bei Ganzzellmessungen auch für den  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanal der *Xenopus* Oozyte gezeigt werden. Messungen am *excised*-Patch der *Xenopus*-Oozytenmembran wurden von Kuruma und Hartzell (2000) und Qu und Hartzell (2000) durchgeführt. Widersprüchlich in der Literatur ist dabei die Spannungsabhängigkeit der Zeitkonstanten des Signalanstiegs nach einem depolarisierenden Spannungssprung: Zum Teil wird eine Spannungsabhängigkeit der Zeitkonstanten gefunden (Marty et al., 1984, Ishikawa und Cook, 1993), während andere von einer Spannungsunabhängigkeit ausgehen (Arreola et al., 1996, Ishikawa, 1996, Kidd und Thorn, 2001). Die eigenen Messungen deuten ebenfalls auf eine Spannungsunabhängigkeit der Zeitkonstanten für die Aktivierung (und damit für die Geschwindig-

keitskonstante  $1/\tau_{Akt.}$ ) hin. Auch Kuruma und Hartzell gehen von einer Spannungsunabhängigkeit aus.

Unstrittig ist dagegen die  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der langsamen Aktivierung: Mit zunehmender  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration erfolgt die Aktivierung des Kanals schneller, bis bei sättigenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration keine Aktivierungsphase mehr zu sehen ist. Die Zeitkonstante der Aktivierung durch einen Spannungssprung bei einer festen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration liegt dabei in der gleichen Größenordnung wie die des Signalanstiegs nach einem Sprung auf eine äquivalente  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bei einem festen Haltepotential. Dies deutet darauf hin, dass den zugehörigen Geschwindigkeitskonstanten der gleiche Reaktionsschritt zugrunde liegt.

Nicht in der Literatur beschrieben wurden bisher Spannungssprungexperimente in hoher Zeitauflösung, wie sie im Rahmen der vorliegende Arbeit durchgeführt wurden. Die bei diesen Experimenten gefundene schnelle Inaktivierung bei stark depolarisierenden Potentialen und sättigender  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf der intrazellulären Seite erklärt damit auch die gefundene Einwärtsgleichrichtung der Strom-Spannungskennlinie des stationären Stroms. Eine mangelnde Kontrolle des Membranpotentials aufgrund der hohen Chloridströme bei den Messungen konnte dagegen ausgeschlossen werden, da diese schnelle Inaktivierung nur bei depolarisierenden Spannungssprüngen zu sehen war, nicht aber bei hyperpolarisierenden Potentialsprüngen mit einer vergleichbar hohen Stromantwort (Messungen ohne anliegenden Chloridkonzentrationsgradienten).

### 5.1.2 Folgerungen für ein *Gating*-Modell

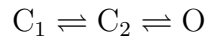
Die Ergebnisse lassen sich damit wie folgt zusammenfassen, um aus ihnen ein Gating-Modell zu erarbeiten:

- Der Hill-Koeffizient ist  $\geq 2$ , sodass wahrscheinlich mindestens zwei  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen binden.
- Nach einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung geht dem Signalanstieg eine Verzögerungs- (*Lag*-)Phase voraus.
- Sowohl die *Lag*-Phase als auch der Signalanstieg sind  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig.
- Die Geschwindigkeitskonstante  $1/\tau$  des Signalanstiegs sättigt bei hohen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen.
- Die *Lag*-Phase und der Signalanstieg sind spannungsunabhängig.
- Im Spannungssprungexperiment zeigt sich eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige langsame Aktivierung bei einer Depolarisation der Membran, deren Geschwindigkeitskonstante  $1/\tau_{Akt.}$  die gleiche Größenordnung wie die des Anstiegs nach einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung hat. Diese langsame Aktivierung ist spannungsunabhängig.
- Im Spannungssprungexperiment zeigt sich eine schnelle Inaktivierung, die zu einer Einwärtsgleichrichtung der Strom-Spannungskennlinie des stationären Stroms

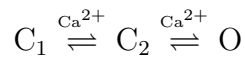
bei depolarisierenden Membranpotentialen führt. Besonders ausgeprägt ist dieses Verhalten bei sättigenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen, wo sich im Spannungssprungexperiment nur eine schnelle Inaktivierung ohne nachfolgende langsame Aktivierung zeigt.

Aus diesen Ergebnissen lassen sich damit entsprechende Rückschlüsse auf ein Gating-Modell ziehen. Im folgenden wird der Zustand des offenen Kanals mit „O“, der Zustand des geschlossenen Kanals mit „C“ und der Zustand des inaktivierten (ebenfalls geschlossenen) Kanals mit „I“ bezeichnet. Treten mehrere Zustände C, O oder I auf, werden die einzelnen Zustände indiziert ( $\text{C}_2$  bezeichnet als den zweiten geschlossenen Zustand). Der Übergang vom Zustand C nach O wird als *Kanalöffnen*, vom Zustand O nach C als *Kanalschließen* bezeichnet. Eine *Inaktivierung* meint den Übergang vom Zustand O nach I, eine *Aktivierung* den Übergang vom Zustand I nach O. Die Inaktivierung/Aktivierung stellt zwar genaugenommen auch ein Schließen/Öffnen des Kanals dar. Diese Bezeichnungen wurden aber gewählt, um eine bessere Zuordnung der Reaktionen auf die einzelnen Kanalzustände zu ermöglichen.

Das Auftreten einer Lag-Phase gibt Hinweise auf die zugrunde liegenden Prozesse. Sie tritt auf, wenn dem beobachteten Zustand (hier: der offene Kanal O) mindestens zwei Zustände (hier: geschlossene Zustände des Kanals  $\text{C}_1$  und  $\text{C}_2$ ) vorausgehen (Gutfreund, 1995):



Da  $\text{Ca}^{2+}$  zum Öffnen des Kanals notwendig ist und mindestens zwei  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen an den Kanal binden, wäre als einfachstes Modell denkbar, dass beide Reaktionsschritte mit der Bindung eines  $\text{Ca}^{2+}$ -Ions verbunden sind:



Ein direkter Übergang vom geschlossenen Zustand zum offenen Zustand unter Bindung eines  $\text{Ca}^{2+}$ -Ions kann aber ausgeschlossen werden, da unter diesen Umständen bei hohen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen die zum Signalanstieg zugehörige Geschwindigkeitskonstante proportional zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ansteigen sollte, anstatt bei hohen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen zu sättigen. Wie die Messungen zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsabhängigkeit aber gezeigt haben, tritt eine Sättigung der Geschwindigkeitskonstanten bei hohen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen auf. Dem Offen Zustand muss also mindestens ein weiterer geschlossener Zustand vorausgehen:



Die beobachtete schnelle Inaktivierung, die insbesondere bei sättigender  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu sehen ist, muss auf einen zusätzlichen Schritt zurückzuführen sein, um den das Schema 5.1 erweitert werden muss:



Dieses *Gating*-Modell soll als Grundlage für die weitere Diskussion dienen und einem von Kuruma und Hartzell (2000) vorgeschlagenen Modell gegenübergestellt werden.

Für die weitere Diskussion soll vereinfacht davon ausgegangen werden, dass beide  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstellen identisch sind, also die gleiche  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsrate  $k_{+1}$  und ebenso die gleiche  $\text{Ca}^{2+}$ -Dissoziationsrate  $k_{-1}$  aufweisen. Das nachfolgende Kanal-Öffnen bzw. -Schließen soll mit den Raten  $k_{op}$  bzw.  $k_{cl}$  bezeichnet werden. Bei zwei identischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungs-/Dissoziationsschritten und einem nachfolgenden Schritt des Kanalöffnens/-Schließens sollte das vorstationäre Stromsignal zwei Phasen aufweisen, die diese Schritte widerspiegeln. Demnach könnte die schnelle Lag-Phase die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung/-Dissoziation und der langsame Signalanstieg das Kanalöffnen/-Schließen bzw. vice versa repräsentieren. Ein Hinweis für die Zuordnung beider Signalphasen auf die Reaktionsschritte des Gating-Modells gibt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten des Signalanstiegs: Ist das Kanalöffnen/-Schließen langsamer als die vorausgehenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungs-/Dissoziationsschritte sollte es durch die langsamere Phase, das heißt, den Signalanstieg, repräsentiert werden. Unter diesen Umständen wären beide  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungs-/Dissoziationsschritte im schnellen Vorgleichgewicht zum Öffnen/Schließen des Kanals (bei sehr niedrigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen ist die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung allerdings immer ratenlimitierend). Dann sollte aber die  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten  $1/\tau_{Anstieg}$  des Signalanstiegs wie die  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit des stationären Chloridstroms am besten mit einer Hill-Gleichung mit einem Hill-Koeffizienten  $n \geq 2$  angepasst werden können (vgl. Grewer, 2000):

$$1/\tau_{Anstieg} = k_{cl} + k_{op} \left( \frac{[\text{Ca}^{2+}]}{[\text{Ca}^{2+}] + K_D} \right)^2 \quad (5.3)$$

Sind dagegen die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungs-/Dissoziationsschritte langsamer als das Kanalöffnen/-Schließen und werden damit durch den langsameren Signalanstieg repräsentiert, dann sollte die Geschwindigkeitskonstante  $1/\tau_{Anstieg}$  linear mit der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ansteigen.

$$1/\tau_{Anstieg} = k_{-1} + k_{+1} \cdot [\text{Ca}^{2+}] \quad (5.4)$$

Bei höheren  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen kommt es dann zu einer Umkehr beider Phasen und damit zu einem Sättigungsverhalten der  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten, da bei hohen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen das Kanalöffnen ratenlimitierend wird.

Die Auswertung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit von  $1/\tau_{Anstieg}$  deutet eher auf einen linearen Anstieg der Geschwindigkeitskonstanten bei niedrigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen hin (siehe Ergebnisteil). Damit wäre das Kanalöffnen/-Schließen schneller als die vorangehenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungs-/Dissoziationsschritte. Die Steigung der linearen Regressionsgeraden  $43.7 \pm 1.4 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  sollte dann die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsrate widerspiegeln, während der Y-Achsenabschnitt  $29.3 \pm 1.8 \text{s}^{-1}$  einen Hinweis auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Dissoziationsrate gibt. Diese Werte sollen daher bei einer späteren Simulation als Ausgangsparameter für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungs- bzw. Dissoziationsrate genommen werden.

Da sich unter diesen Bedingungen die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungs-/Dissoziationsschritte nicht im schnellen Vorgleichgewicht zum nachfolgenden Öffnen/Schließen des Kanals befinden, lässt sich das dem Schema 5.1 zugrunde liegende Differentialgleichungssystem nicht analytisch lösen, wie es z.B. Grewer (2000) für das Gating-Modell des Glycin-Rezeptors gezeigt hat. Beim Glycin-Rezeptor, einem Liganden-gesteuerten Chloridkanal, befinden sich die

Bindungs-/Dissoziationschritte mehrerer Glycin-Liganden im schnellen Vergleichgewicht zum nachfolgenden Öffnungsschritt. Grewer konnte daher durch das analytische Lösen des nach dem Gating-Modell aufgestellten Differentialgleichungssystems zeigen, dass sich die Lag-Phase des Glycin-Rezeptorsignals mit einer Summe von Exponentialfunktionen anpassen lässt und dass so eine Geschwindigkeitskonstante  $k_{lag}$  für die Lag-Phase bestimmt werden kann. Dies ist bei den hier vorliegenden Umständen nicht möglich. Daher wurde im Experimententeil auch auf eine quantitative Auswertung der Lag-Phase verzichtet.

Sowohl die Lag-Phase als auch der Signalanstieg haben sich als praktisch spannungsunabhängig erwiesen. Die Spannungssprungexperimente haben dagegen gezeigt, dass es spannungsabhängige Schritte im Gating-Modell geben muss. Ansonsten wäre die langsame Aktivierung (Signalanstieg) bei nichtsättigenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen nach einer Depolarisation der Membran nicht erklärbar. Da die langsame Aktivierung das gleiche zeitliche Verhalten zeigt, wie der Signalanstieg nach einem schnellen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung, liegt die Vermutung nahe, dass beides mal die gleiche Reaktion betrachtet wird. Demnach könnte die langsame Aktivierung auf das Nachbinden von  $\text{Ca}^{2+}$  zurückzuführen sein. Der Kanal muss dann bei depolarisierenden Membranpotentialen eine höhere apparente  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität aufweisen als bei hyperpolarisierenden Membranpotentialen. Ein solches Verhalten wurde auch tatsächlich von Qu und Hartzell (2000) für den  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanal in der *Xenopus* Oozytenmembran gezeigt (Änderung der apparenten  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität um den Faktor 4.5 zwischen -100 und +100 mV Membranpotential). Eine solche Erhöhung der apparenten  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität bei depolarisierenden Membranpotentialen, die letztendlich auf eine Zustandsverschiebung durch die Änderung des Membranpotentials zurückzuführen ist, könnte zum einen durch eine spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung/Dissoziation, zum anderen durch ein spannungsabhängiges Öffnen/Schließen des Kanals oder einer Kombination beider Möglichkeiten im Rahmen des Gating-Modells in Schema 5.2 erfolgen. Ebenso muss die schnelle Inaktivierung auf einen zusätzlichen spannungsabhängigen Schritt zurückzuführen sein.

Das Gating-Modell 5.2 wurde genutzt, um mit Hilfe der *Scientist*-Software das zu erwartende Chloridstromsignal zu simulieren. Dazu wurde zunächst ein System von gekoppelten Differentialgleichungen entsprechend dem Schema 5.1 aufgestellt und dieses numerisch integriert. Das Stromsignal  $i(t)$  wurde hierbei über die Goldman-Hodgkin-Katz-(GHK-)Gleichung für einen asymmetrischen Chloridgradienten (entsprechend den experimentellen Bedingungen) errechnet (siehe Tabelle 5.1). Die Parameter für die Ratenkonstanten wurden dann durch eine Anpassung des simulierten Stromsignals an experimentell gemessene Stromsignale nach einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung bei 0 mV mittels eines *least-square*-Fit-Algorithmus ermittelt. Schema 5.2 wäre für diese Anpassungen überparametrisiert. Die Ratenkonstanten für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung und Dissoziation wurden gemäß den Regressionsparametern der  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten  $1/\tau_{Anstieg}$  des Signalanstieg (siehe Ergebnisteil bzw. Tabelle 5.1) als Startparameter für den *least-square*-Fit vorgegeben, aber nicht festgehalten, um eine bessere Konvergenz des Integrationsalgorithmus (*Episode-Stiff*) der *Scientist*-Software zu erreichen. Die aus dieser Anpassung an gemessenen Stromsignalen bei 0 mV Membranpotential gewonnenen Parameter wurden dann als Ausgangsparameter für eine numerische Integration

des Differentialgleichungssystems gemäß Schema 5.2 (siehe Tabelle 5.1) und einer *least-square*-Algorithmus-Anpassung an experimentelle Stromsignale eines Spannungssprung-experiments genommen. Dabei wurde dann insbesondere die Lage der spannungsabhängigen Schritte variiert, bis eine bestmögliche Anpassung der Daten erreicht wurde.

Das Ergebnis ist in Abbildung 5.1 dargestellt. Mit den in Tabelle 5.1 zusammengefassten Fitparametern für die Simulation lassen sich die experimentellen Daten gut reproduzieren: Die simulierten Chloridströme eines Spannungssprungexperiments bei nichtsättigender  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zeigen die langsame Aktivierung und stimmen sehr gut mit den experimentellen Kurven überein (Abb. 5.1 A). Der instantane Strom vor der langsam ansteigenden Aktivierungsphase wird ebenfalls gut reproduziert und ist auf die bereits im offenen Zustand befindlichen Kanäle zurückzuführen. Bei der Simulation der Spannungssprünge ergibt sich bei sättigender  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration die in den Experimenten gefundene schnelle Inaktivierung (Abb. 5.1 B, links) besonders deutlich. Diese führt zu der Einwärtsgleichrichtung der Strom-Spannungskennlinie des stationären Stroms (Abb. 5.1 B, rechts), während die Strom-Spannungskennlinie des Spitzenstroms dagegen zwar insgesamt exponentiell verläuft (wie es gemäß der *GHK*-Gleichung und einem asymmetrischen Chlorid-Gradienten zu erwarten ist), aber im positiven Spannungsbereich nahezu linear ist. Die Simulation eines  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrations Sprunges ergibt sowohl eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Lag-Phase als auch einen  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Signalanstieg, die beide nur eine schwache Spannungsabhängigkeit aufweisen (Abb. 5.1 C, links vs. rechts).

Die Fitparameter für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung ( $31 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) und  $\text{Ca}^{2+}$ -Dissoziation ( $30 \text{ s}^{-1}$ ) stimmen gut mit den aus den experimentellen Daten bestimmten Werten ( $29.3 \pm 1.8 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  bzw.  $43.7 \pm 1.4 \text{ s}^{-1}$ ) überein. Die Rate für das Öffnen (Reaktionsschritt  $\text{C}_3 \rightarrow \text{O}$ ) hat sich zu  $1200 \text{ s}^{-1}$  ergeben und ist damit deutlich schneller als die vorausgehende  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung bzw. Dissoziation. Die Rate für das Kanalschließen ( $\text{C}_3 \leftarrow \text{O}$ ) liegt gemäß dem Least-Square-Fit bei  $200 \text{ s}^{-1}$ . Diese Rate scheint zwar der von Takahashi et al. (1987) berichteten mittleren Offenzeit von  $\approx 100 \text{ ms}$  bei Einzelkanalmessungen zu widersprechen, allerdings berichten Qu und Harzell (2000) von einem hochfrequentem Flickern des Kanals bei Einzelkanalableitungen. Daher kommen *Bursts* des  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanals als Erklärung für diese Diskrepanz in Betracht. Die Inaktivierung ( $\text{O} \rightarrow \text{I}$ ) erfolgt gemäß den Fitparameter mit ca.  $160 \text{ s}^{-1}$ , das Aktivieren ( $\text{O} \leftarrow \text{I}$ ) mit einer Rate von ca.  $1900 \text{ s}^{-1}$ . Dieser Reaktionsschritt  $\text{O} \rightleftharpoons \text{I}$  hat dabei eine starke Spannungsabhängigkeit ( $\alpha_3=0.61$ ), ansonsten wäre die Inaktivierung bei stark depolarisierenden Potentialen auch nicht verständlich. Ein spannungsabhängiges Öffnen/Schließen ( $\text{C}_3 \rightleftharpoons \text{O}$ ) des Kanals scheint nach den Simulationen eher unwahrscheinlich, da dann der simulierte Signalanstieg nach einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung eine zu starke Spannungsabhängigkeit zeigte. Dagegen hat sich eine Spannungsabhängigkeit des  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungs-/Dissoziationsschritts  $\text{C}_i \xrightleftharpoons{\text{Ca}^{2+}} \text{C}_{i+1}$  ( $\alpha_1=0.19$ ) als notwendig erwiesen, um eine apparente  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinitätserhöhung des Kanals bei einer Depolarisation der Membran zu schaffen und um so den langsamen Signalanstieg zu erreichen. Durch den spannungsabhängigen Bindungs-/Dissoziationsschritt wird auch die Spannungsabhängigkeit des Signalabfalls nach dem Auswaschen von  $\text{Ca}^{2+}$  verständlich, wie sie von Kuruma und Hartzell (2000) und Gomez-Hernandez et al. (1997) beobachtet wurde: Bei Wegnahme des  $\text{Ca}^{2+}$  wird der

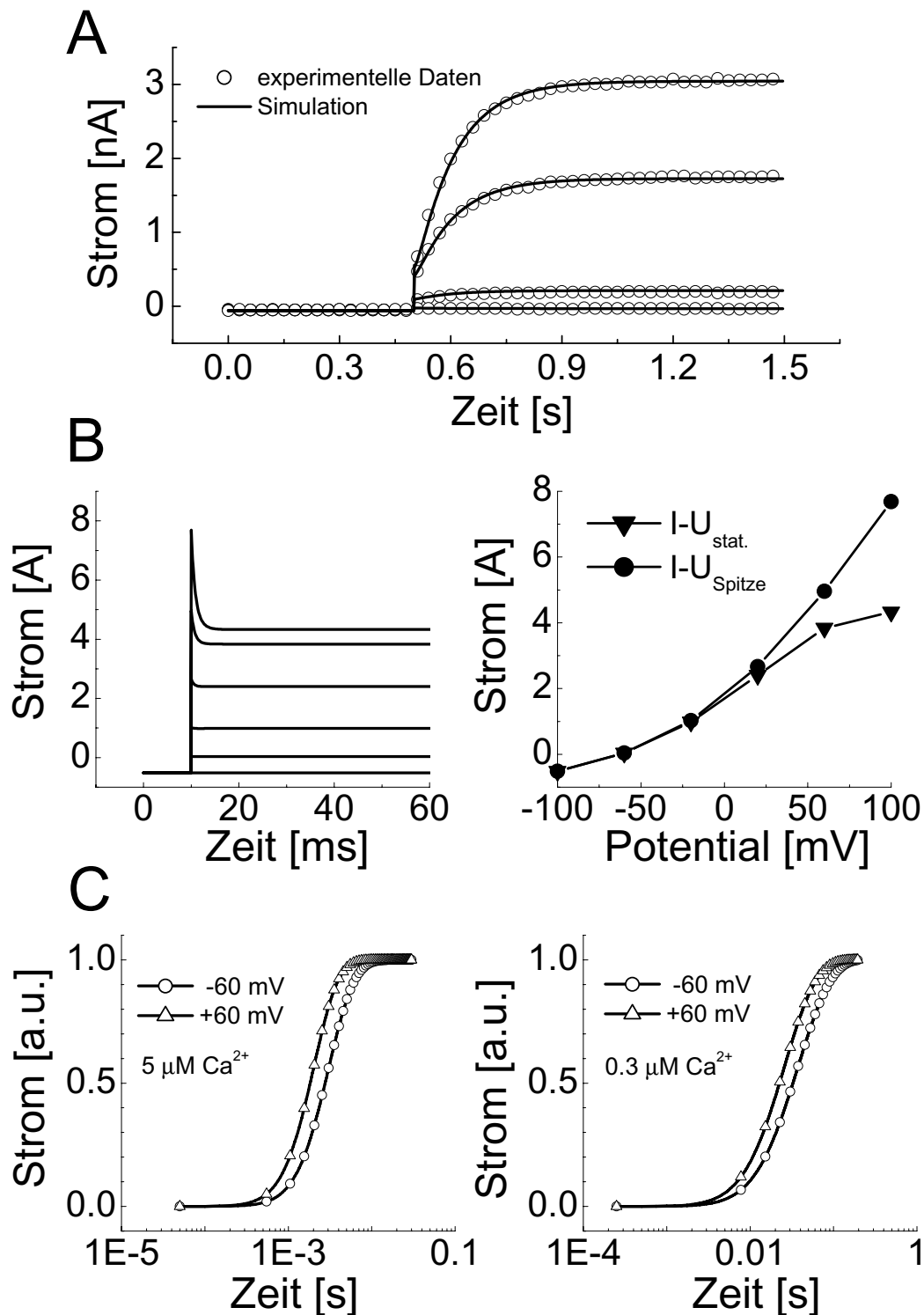


Abbildung 5.1: Simulation mit dem vorgeschlagenen Gating-Modell

A Spannungssprünge bei niedrig  $\text{Ca}^{2+}$ : Vergleich der Simulation mit den experimentellen Daten

B Simulation der Spannungssprünge bei sättigender  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration: Das Signal zeigt die schnelle Inaktivierung bei einer Depolarisation der Membran (links) und damit auch die Einwärtsgleichrichtung der Strom-Spannungskennlinie des stationären Stroms, während die Strom-Spannungskennlinie des Spitzenstroms im positiven Spannungsbereich näherungsweise linear verläuft (rechts).

C Simulation eines  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrations Sprunges bei hoch (links) und niedrig  $\text{Ca}^{2+}$  (rechts): Sowohl die Lag-Phase als auch der Signalanstieg sind deutlich  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig, aber nur schwach spannungsabhängig.



$\begin{aligned} \dot{C}_1 &= -2 \cdot k_{+1}^0 \cdot e^{-\left(\frac{V_M e_0 \alpha_1}{2kT}\right)} \cdot [\text{Ca}^{2+}] \cdot C_1 + k_{-1}^0 \cdot e^{\left(\frac{V_M e_0 \alpha_1}{2kT}\right)} \cdot C_2 \\ \dot{C}_2 &= +2 \cdot k_{+1}^0 \cdot e^{-\left(\frac{V_M e_0 \alpha_1}{2kT}\right)} \cdot [\text{Ca}^{2+}] \cdot C_1 + 2 \cdot k_{-1}^0 \cdot e^{\left(\frac{V_M e_0 \alpha_1}{2kT}\right)} \cdot C_3 \\ &\quad - k_{-1}^0 \cdot e^{\left(\frac{V_M e_0 \alpha_1}{2kT}\right)} \cdot C_2 - k_{+1}^0 \cdot e^{-\left(\frac{V_M e_0 \alpha_1}{2kT}\right)} \cdot [\text{Ca}^{2+}] \cdot C_2 \\ \dot{C}_3 &= +k_{+1}^0 \cdot e^{-\left(\frac{V_M e_0 \alpha_1}{2kT}\right)} \cdot [\text{Ca}^{2+}] \cdot C_2 + k_{cl}^0 \cdot e^{\left(\frac{V_M e_0 \alpha_2}{2kT}\right)} \cdot O \\ &\quad - 2 \cdot k_{-1}^0 \cdot e^{\left(\frac{V_M e_0 \alpha_1}{2kT}\right)} \cdot C_3 - k_{op}^0 \cdot e^{-\left(\frac{V_M e_0 \alpha_2}{2kT}\right)} \cdot C_3 \\ \dot{O} &= +k_{op}^0 \cdot e^{-\left(\frac{V_M e_0 \alpha_2}{2kT}\right)} \cdot C_3 + k_{akt.}^0 \cdot e^{\left(\frac{V_M e_0 \alpha_3}{2kT}\right)} \cdot I \\ &\quad - k_{cl}^0 \cdot e^{\left(\frac{V_M e_0 \alpha_2}{2kT}\right)} \cdot O - k_{inakt.}^0 \cdot e^{-\left(\frac{V_M e_0 \alpha_3}{2kT}\right)} \cdot O \\ \dot{I} &= +k_{inakt.}^0 \cdot e^{-\left(\frac{V_M e_0 \alpha_3}{2kT}\right)} \cdot O - k_{akt.}^0 \cdot e^{\left(\frac{V_M e_0 \alpha_3}{2kT}\right)} \cdot I \\ i(t) &= O \cdot \gamma \cdot P_S \cdot z_S \cdot \frac{V_M F^2}{RT} \cdot \frac{[\text{Cl}^-]_{intr.} - [\text{Cl}^-]_{extr.} \cdot e^{-V_M z_S F/RT}}{1 - e^{-V_M z_S F/RT}} \end{aligned}$		
$\text{Ca}^{2+}$ -Bindung $k_{+1}^0$	$31 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$29.3 \pm 1.8 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ aus exp. Daten
$\text{Ca}^{2+}$ -Dissoziation $k_{-1}^0$	$30 \text{ s}^{-1}$	$43.7 \pm 1.4 \text{ s}^{-1}$ aus exp. Daten
Spannungsabhängigkeit $\alpha_1$	0.19	
Kanalöffnen $k_{op}^0$	$1200 \text{ s}^{-1}$	
Kanalschließen $k_{cl}^0$	$200 \text{ s}^{-1}$	
Spannungsabhängigkeit $\alpha_2$	0	
Inaktivierung $k_{inakt.}^0$	$160 \text{ s}^{-1}$	
Aktivierung $k_{akt.}^0$	$1910 \text{ s}^{-1}$	
Spannungsabhängigkeit $\alpha_3$	0.61	

Tabelle 5.1: Simulationsparameter des vorgeschlagenen Gating-Modells

Das simulierte Stromsignal wurde über die *GHK*-Gleichung  $i(t)$  errechnet. Die Chloridkonzentrationen wurden für die Simulationen entsprechend den experimentellen Bedingungen (asymmetrischer Chloridgradient: intrazellulär 5 mM, extrazellulär 114 mM) gewählt.

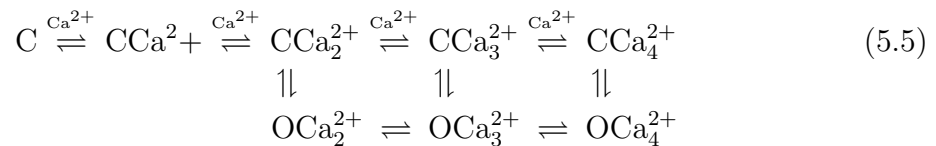
( $V_M$ : Membranpotential,  $\alpha_i$ : Dielektrizitätskoeffizient als Maß für die Spannungsabhängigkeit,  $\gamma$ ,  $P_S$ ,  $z_S$ ,  $F$ ,  $R$ ,  $T$ ,  $e_0$ ,  $k$  mit ihren üblichen Bedeutungen.)

Signalabfall im wesentlichen durch die spannungsabhängige Dissoziationsrate bestimmt. Eine spannungsabhängige Bindung/Dissoziation wurde auch von Arreola et al. (1996) für die  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanäle in Speicheldrüsenzellen der Ratte vorgeschlagen. Callamaras und Parker (2000) gehen für den  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanal der *Xenopus* Oocyte zwar auch von einem spannungsunabhängigen Öffnen/Schließen aus (wie es aus den hier gezeigten Simulationen folgt), schlagen stattdessen aber nur eine spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Dissoziation (bei spannungsunabhängiger Bindung) vor.

### Vergleich mit den *Large Conductance (MaxiK)* $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten $\text{K}^+$ -Kanälen

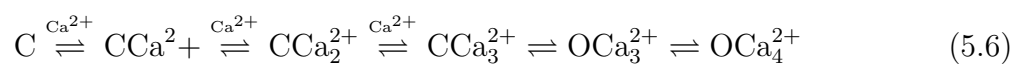
Kuruma und Hartzell (2000) schlagen statt des hier favorisierten Reaktionsschemas 5.2 ein komplexeres Schema vor (siehe unten). Sie sind bei der Aufstellung ihres Reaktionsschema stark von bestehenden Schemata für die *Large Conductance* (Maxi)  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten  $\text{K}^+$  Kanäle (auch *BK-Kanäle* genannt) beeinflusst worden, so dass an dieser Stelle zunächst kurz auf die *Large Conductance* (Maxi)  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten  $\text{K}^+$  Kanäle eingegangen werden soll.

Die BK-Kanäle werden wie die  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanäle durch intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  aktiviert und zeigen ebenfalls eine Aktivierung bei depolarisierenden Membranpotentialen, die denen der CLCA ähnelt. Der Hill-Koeffizient deutet mit  $n=3.7$  ebenso wie bei den CLCA auf die Bindung von mehreren  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen hin. Dennoch gibt es deutliche Unterschiede im Verhalten: So deuten Einzelkanalableitungen auf multiple Offenzustände hin (Latorre, 1994), sodass für die BK-Kanäle komplexere Gating-Modelle diskutiert werden, von denen das im Schema 5.5 gezeigte (mit drei Offenzuständen) noch ein relativ einfaches Modell darstellt.



Mittlerweile werden bis zu 25 Offenzustände diskutiert (Magleby, 2001). Für die  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanäle mangelt es in diesem Zusammenhang an detaillierten Einzelkanalstudien, die eventuell ebenfalls auf mehrere Offenzustände hinweisen bzw. Ähnlichkeiten der CLCA mit den BK-Kanälen aufzeigen könnten.

Abhängig von den kinetischen Parametern werden einzelne Zustände der komplexen Modelle bevorzugt besetzt, so dass sich die komplexen Modelle z.T. auf einfachere Modelle („Gating-Pfad“) reduzieren lassen. Als bevorzugter Gating-Pfad im Schema 5.5 hat sich dabei ein lineares Schema mit Bindung von drei  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und zwei Offenzuständen herausgestellt (Latorre, 1994):



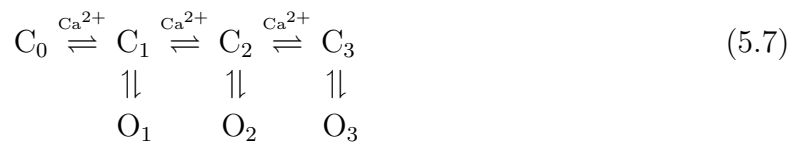
Das einfache lineare Reaktionsschema 5.2 für die  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanäle könnte daher ebenfalls ein bevorzugter Reaktionspfad eines tatsächlich (bzw. sogar wahrscheinlich) weitaus komplexeren Reaktionsmodells sein.

Mit einem ähnlichen einfachen, linearen Schema wie 5.6 (allerdings mit nur einem Offenzustand) haben Markwardt und Isenberg (1992) zuvor eine detaillierte Analyse der Kinetik der BK-Kanäle durchgeführt. Dabei haben sie eine spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung/Dissoziation vorgeschlagen und die Ratenkonstanten zu  $9 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  bzw.  $27 \text{s}^{-1}$  bestimmt. Vergleichbare Raten haben auch Gurney et al. (1987) für den  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Apamin-sensitiven  $\text{K}^+$ -Kanal gefunden:  $20.5 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung bzw.  $25 \text{s}^{-1}$  für die Dissoziation. Gurney und Mitarbeiter haben bei ihren Untersuchungen schnelle  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrations sprünge mittels Photolyse von *nitr-5*, einem photolabilen  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator wie DM-Nitrophen, durchgeführt. Diese Werte stimmen jeweils gut mit den Fitparametern für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung/Dissoziation für den  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanal überein. Dies spricht dafür, dass die über die numerische Integration bestimmte Größenordnung der Raten für den  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanal durchaus sinnvoll sein können.

Beim Vergleich der Kinetik der BK-Kanäle mit den CLCA bleibt anzumerken, dass neuere Modelle eine spannungsabhängige Bindung in Frage stellen (Lingle et al., 1996, Cui et al., 1997). Hierfür spricht insbesondere die Tatsache, dass die BK-Kanäle alleine durch eine Membrandepolarisation, ohne zuvor  $\text{Ca}^{2+}$  gebunden zu haben, sich öffnen können (Cui et al., 1997). Nach den bisherigem Kenntnisstand gilt dies für die CLCA nicht:  $\text{Ca}^{2+}$  ist zwingend notwendig für eine Aktivierung des Kanals.

### Reaktionsmodell nach Kuruma und Hartzell

Aufbauend auf die für die BK-Kanäle vorgeschlagenen Reaktions-Modelle haben Kuruma und Hartzell (2000) folgendes Modell für die  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanäle der *Xenopus* Oozytenmembran vorgeschlagen:



Gating-Modell nach Kuruma und Hartzell (2000)

$\text{Ca}^{2+}$ -Bindung:  $3 \cdot 10^{-6} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ -Dissoziation:  $50 \text{s}^{-1}$ ,  $k_{op1}=10 \text{s}^{-1}$  (spannungsunabhängig),  $k_{cl1}=5 \text{s}^{-1}$  (spannungsabhängig),  $k_{op2}=30 \text{s}^{-1}$  (spannungsunabhängig),  $k_{cl2}=5 \text{s}^{-1}$  (spannungsabhängig),  $k_{op3}=100 \text{s}^{-1}$  (spannungsunabhängig),  $k_{cl3}=5 \text{s}^{-1}$  (spannungsabhängig)

Auffallend an dem von Kuruma und Hartzell bevorzugten Gating-Modell ist die Lage der spannungsabhängigen Schritte: Kuruma und Hartzell postulieren, dass nur das Schließen der drei Offenzustände spannungsabhängig sei. Das Öffnen des gleichen Reaktionsschrittes soll dagegen spannungsunabhängig sein. Eine solche Asymmetrie der Spannungsabhängigkeit hatten bereits zuvor Arreola et al. (1996) vorgeschlagen. Sie ist aber nicht ohne weiteres zu akzeptieren, da im einfachsten Fall einer symmetrischen Energiebarriere sowohl die Hin- als auch die Rückrate spannungsabhängig sein muss. Eine Asymmetrie bedarf daher einer speziellen Begründung, die durch die Messdaten belegt sein sollte. Diese bleiben Kuruma und Hartzell schuldig. Eine Asymmetrie der Spannungsabhängigkeit ist nicht vollständig auszuschließen: So erklärt z.B. das *Access Chan-*

*nel*-Modell bei der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase die Asymmetrie der Spannungsabhängigkeit, wobei hier bei der theoretischen Behandlung ein Drei-Zustands-Modells auf ein Pseudo-Zwei-Zustands-Modell reduziert wurde, das dadurch eine asymmetrische Spannungsabhängigkeit aufweist (Sagar und Rakowski, 1994). Die Asymmetrie der Spannungsabhängigkeit kommt letztendlich durch das elektrische Feld innerhalb des Zugangskanals, das die  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ -Ionen durchqueren müssen, um die Bindungsstellen zu erreichen, zustande. Die von Kuruma und Hartzell eingeführte Asymmetrie der Spannungsabhängigkeit des Öffnens/Schließens lässt sich dagegen nicht so ohne weiteres erklären.

Abgesehen von dieser Unstimmigkeit, was die Lage der spannungsabhängigen Schritte bestimmt, wäre ein Modell nach Kuruma und Hartzell durchaus denkbar. Allerdings nicht mit den von ihnen ermittelten Parametern: Die Signale nach einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung zeigen eine zu langsame Kinetik, wie Abbildung 5.2 verdeutlicht. Hier gilt aber zu berücksichtigen, dass Kuruma und Hartzells experimentelle Daten, nach denen sie ihre Parameter angepasst haben, durch die Verwendung von  $\text{Mg}^{2+}$  in der Badlösung beeinflusst wurden, worauf Qu und Hartzell (2000) hinweisen.

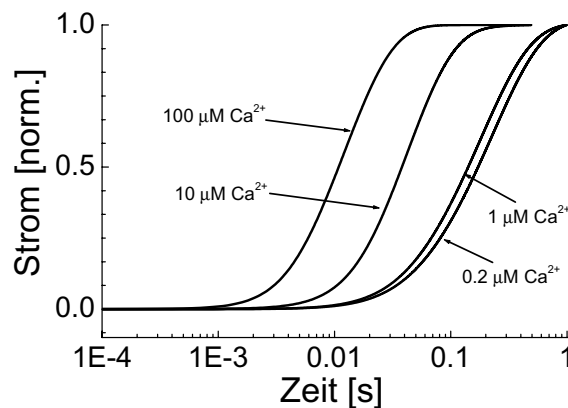


Abbildung 5.2: Simulation des  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridstroms mit dem Modell nach Kuruma und Hartzell

Der Chloridstrom nach einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung bei 0 mV lässt sich prinzipiell auch mit dem von Kuruma und Hartzell vorgeschlagenen Modell simulieren. Allerdings sind die Zeitkonstanten der Lag-Phase und des Signalanstiegs zu langsam.

Da sich bei den BK-Kanälen gezeigt hat, dass es oftmals einen bevorzugten Gating-Pfad gibt (Latorre, 1994), ergibt sich unter Umständen das in Schema 5.1 vorgeschlagene lineare Reaktionsmodell. Eine Berücksichtigung der später von Qu und Hartzell (2000) verifizierten höheren  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität und schnelleren Kinetik des Kanals würde zudem eine Anpassung der von Kuruma und Hartzell angegebenen Raten notwendig machen, die dann möglicherweise auch die in dieser Arbeit vorgeschlagenen Werte bestätigen würden.

Generell ist ein solches Modell, wie es von Kuruma und Hartzell bzw. für die BK-Kanäle vorgeschlagen wird, überparametrisiert, um aus den Messdaten Rückschlüsse auf die Ratenkonstanten ziehen zu können. Daher ist es nicht verwunderlich, dass auch das von Kuruma und Hartzell vorgeschlagene Modell die experimentellen Signale nach einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung erklären kann. Für die BK-Kanäle deuten zumindest Einzelkanalableitungen auf multiple Offenzustände hin, die diese komplexeren Modelle rechtfertigen.

tigen (Latorre, 1994). Für die CLCA fehlen diese Daten noch. Zudem bleibt die Lage der spannungsabhängigen Schritte offen, da Kurumas und Hartzells Modell hier keine befriedigende, akzeptable Antwort gibt. Gänzlich unberücksichtigt bleibt in deren Modell die schnelle Inaktivierung bei einer Depolarisation der Membran: Diese ist mit dem Reaktionsmodell nach Kuruma und Hartzell auch nach einer Anpassung der Parameter nicht erklärbar.

### 5.1.3 Ausblick

Sowohl das im Rahmen dieser Arbeit vorgeschlagene lineare Gating-Modell in Schema 5.2 als auch das Gating-Modell nach Kuruma und Hartzell in Schema 5.7 haben einen wichtigen Faktor unberücksichtigt gelassen: den Einfluss des permeierenden Anions. Qu und Hartzell (2000) haben gezeigt, dass das permeierende Anion einen deutlichen Effekt auf die Kinetik hat. Um dies erklären zu können, muss das Anion in einem möglichen Gating-Modell berücksichtigt werden. Ein Einfluss des permeierenden Anions auf das Gating eines Kanals ist bereits von den ClC-Chloridkanälen bekannt (Pusch et al., 1995, Pusch, 1996, Rychkov et al., 1998): Möglicherweise stellt die Bindung des Anions an eine externe Bindungsstelle und die Bewegung dieser Bindungsstelle zusammen mit dem Anion innerhalb des elektrischen Feldes den spannungssensitiven Schritt dar (Chen und Miller, 1996, Jentsch et al., 1999).

Für die  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanäle wäre es daher durchaus denkbar, dass das permeierende Anion eine ähnliche Rolle spielt wie für die ClC-Chloridkanäle. Die möglichen Anionen- und spannungsabhängigen Schritte innerhalb eines Gating-Modells könnten ein wichtiges Bindeglied zwischen einem linearen Gating-Modell und einem Gating-Modell mit multiplen Offenzuständen darstellen. Eine einfache Erweiterung des linearen Schemas um mögliche Anionen-abhängige Schritte ist in Abbildung 5.3 dargestellt und soll aus Ausblick dienen.

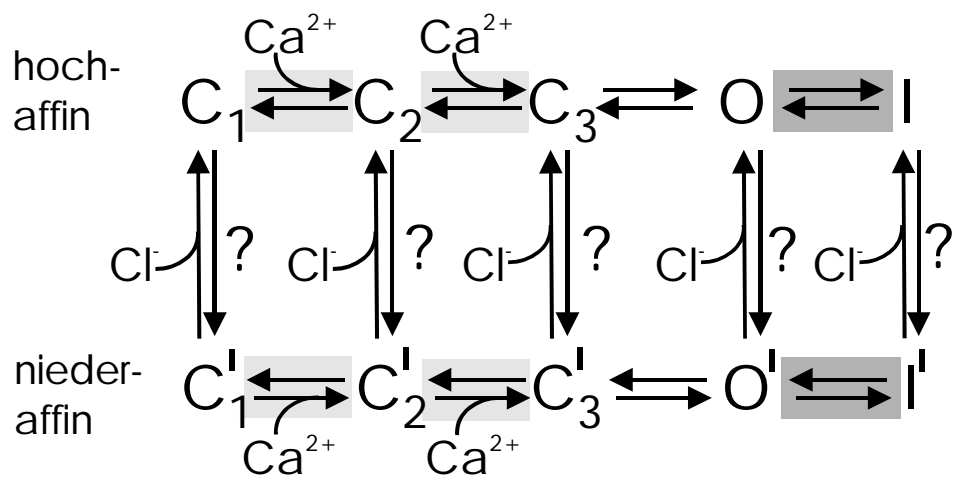


Abbildung 5.3: Gating-Modell mit Anionen-abhängigen Reaktionsschritten

Das lineare Gating-Modell nach 5.2 wurde um spannungs- und Anionen-abhängige Schritte erweitert, die einen Übergang von einer hochaffinen zu einer niederaffinen Kanalkonformation darstellen. Unterlegte Schritte: spannungsabhängige Schritte aus dem linearen Gating-Modell in Schema 5.2.

## 5.2 Der heterolog exprimierte $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher NCX1

Ziel der Messungen am heterolog in *Xenopus* exprimierten  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher war es, detaillierte Kenntnisse über die Kinetik des Austauschers zu erlangen, um aus diesen nun ein Reaktionsmodell aufzustellen. Bei den Messungen hat sich die Bedeutung von photolabilen Substanzen für kinetische Untersuchungen bestätigt: Wie der native Austauscher, so hat auch der heterolog exprimierte Austauscher vorstationäre Ströme mit sehr schneller Kinetik nach einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung mittels Photolyse von DM-Nitrophen gezeigt, die mit einem Lösungswechselsystem zeitlich nicht aufzulösen gewesen wären.

Im folgenden sollen nun die Ergebnisse mit früheren Messungen am nativen Austauscher sowie mit Literaturdaten verglichen werden. Anschließend soll aus den Ergebnissen der Messungen im  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch zunächst ein kinetisches Modell für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Translokation erstellt werden. Die Beschränkung auf einen Transporthalbzyklus des  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers erleichtert das Finden der Ratenkonstanten über eine numerische Integration des vorgeschlagenen Transportmodells. Ausgehend von den so gefundenen Ratenkonstanten für den Halbzyklus der  $\text{Ca}^{2+}$ -Translokation soll das Reaktionsschema auf den vollständigen Zyklus des  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschs erweitert werden. Die im  $\text{Ba}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch sowie bei nicht-sättigenden extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen gefundene zusätzliche Abklingphase des transienten Stromsignals wird im Rahmen des  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschs diskutiert werden.

### 5.2.1 Messungen im $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch-Modus

Die Messungen im  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch-Modus mit 100 mM  $\text{Na}^+$  extrazellulär und intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprüngen erfolgten zum einen per Lösungswechsel, zum anderen per Photolyse von DM-Nitrophen. Die Lösungswechslexperimente stellten im wesentlichen nur eine Überprüfung der erfolgreichen Klonierung und Expression des Austauschers dar. Die gefundene apparente  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität von  $7.0 \pm 0.5 \mu\text{M}$  liegt im Rahmen der Literaturwerte: Von Matsuoka und Hilgemann (1992) wurden  $2.7 \mu\text{M}$  gemessen (bei 80 mM  $\text{Na}^+$  extrazellulär), von M. Kappl (1997)  $4.1 \pm 0.2 \mu\text{M}$  an Meerschweinchenherzmembranen bzw.  $9.8 \pm 0.7 \mu\text{M}$  an Rattenherzmembranen (jeweils 100 mM  $\text{Na}^+$  extrazellulär). Die Abweichungen zwischen den Werten können zum einen durch die nicht triviale Einstellung der freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in den verwendeten Lösungen herrühren (vgl. Campbell, 1983, Bers et al., 1994), zum anderen kann aber auch durchaus die unterschiedliche Lipidumgebung der Membran (und damit verbundener Unterschiede in der Ladungsdichte) Einflüsse auf das Protein haben.

Ein wichtiger Test der funktionellen Expressierung war die Deregulation des Austauschers durch  $\alpha$ -Chymotrypsin (Hilgemann, 1990): Nach Behandlung der intrazellulären Membranseite mit  $\alpha$ -Chymotrypsin hat auch der exprimierte Austauscher die typische Aufhebung der  $\text{Na}^+$ -abhängigen Inaktivierung durch  $\alpha$ -Chymotrypsin gezeigt. Nach den Lösungswechslexperimenten kann man daher von einer funktionellen Expressierung des Austauschers ausgehen. Dies wurde zudem bereits vorher von anderen Arbeitsgruppen

gezeigt (Nicoll et al., 1990, Tsuruya et al., 1994). Durch die Behandlung des Austauschers mit  $\alpha$ -Chymotrypsin vor allen Messungen und der damit verbundenen Deregulation des Austauschers kann der Einfluss der regulatorischen Bindungsstellen bei der später folgenden Interpretation der Ergebnisse vernachlässigt werden.

Unbekannt war dagegen bisher der Einfluss des Expressionssystem auf die Kinetik des vorstationären Stroms nach einem schnellen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung mittels Photolyse von DM-Nitrophen. Die vorgestellten Messungen haben auch hier eine große Übereinstimmung mit den Messungen am nativen Austauscher gezeigt: Ebenso wie beim nativen Austauscher gibt es nach einem intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung einen sehr schnell ansteigenden Einwärtsstrom, der dann im Vergleich zum Stromanstieg langsam auf einen stationären Einwärtsstrom abfällt. Dieses „langsame“ Abfallen geschieht dabei immer noch so schnell, dass es mit einem herkömmlichen Lösungswechselsystem nicht aufzulösen gewesen wäre. Dieses transiente Stromsignal war nur bei Messungen an den Austauscher exprimierenden Oozytenmembranen, nicht aber an Kontrolloozytenmembranen zu registrieren. Daher kann angenommen werden, dass das transiente Stromsignal tatsächlich vom Austauscher herrührt, und nicht auf z.B. die Verschiebung von Oberflächenladungen nach dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung zurückzuführen ist. Diese Kontrollexperimente haben zudem gezeigt, dass durch den Einsatz chloridfreier Lösungen der endogene  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte Chloridkanal in der Oozytenmembran wirkungsvoll unterdrückt werden kann, sodass dieser die Messungen am  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher nicht beeinflusst hat. Umfangreiche Kontrollmessungen bezüglich DM-Nitrophen und seiner Photolyseprodukte wurden bereits vorher von Kappl und Hartung (1996b) durchgeführt: Kappl und Hartung hatten bei Messungen an Myocytenmembranen bereits gezeigt, dass weder DM-Nitrophen selbst noch seine Photolyseprodukte inhibierend auf den Austauscher wirken und dass das transiente Stromsignal allein auf eine Aktivierung des Austauschers durch den  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung zurückzuführen ist. Mit den Messungen am in *Xenopus* Oozyten heterolog exprimierten Austauscher konnten diese Ergebnisse bestätigt werden.

Das vorstationäre Stromsignal im  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch hat bei  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprüngen  $> 20 \mu\text{M}$  den selben sehr schnellen Anstieg ( $\tau < 50 \mu\text{s}$ ), der messtechnisch nicht aufzulösen war, gezeigt, wie er vom nativen Austauscher bekannt ist (Kappl und Hartung, 1996a, b). Bei Freisetzung sehr hoher  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen ( $\Delta \text{Ca}^{2+} \geq 400 \mu\text{M}$ ) erfolgte der Abfall des Spitzenstroms auf den stationären Strom mit einer Geschwindigkeitskonstanten  $1/\tau_{\text{Abfall}} > 8000 \text{ s}^{-1}$  (bei Raumtemperatur). Die Geschwindigkeitskonstante ist damit deutlich größer, als sie von den bisherigen Messungen am nativen Austauscher ( $< 4000 \text{ s}^{-1}$ ) bekannt war (Kappl und Hartung, 1996b). Der Grund liegt wahrscheinlich an der freigesetzten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ( $\leq 100 \mu\text{M}$ ), die bei früheren Messungen möglicherweise nicht sättigend für den Austauscher war. Ein genereller Unterschied zwischen der Kinetik des nativen und des exprimierten Austauschers ist allerdings nicht auszuschließen.

Bei Variation der freigesetzten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration hat das vorstationäre Stromsignal eine starke  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit gezeigt: Sowohl der Spitzenstrom als auch die Geschwindigkeitskonstante des Signalabfalls wurden deutlich kleiner bei niedrigeren  $\text{Ca}^{2+}$ -



Konzentrations sprünge. Bei kleinen  $\Delta$  Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen unter 10  $\mu$ M stieg das Signal ohne Überschießer biexponentiell auf den stationären Strom an, während bei hohen Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen sowohl der Spitzenstrom als auch die Geschwindigkeitskonstante des Signalabfalls sättigten. Die apparenten Ca<sup>2+</sup>-Affinitäten des Spitzenstroms und der Geschwindigkeitskonstanten lagen bei  $30.9 \pm 3.0$  bzw.  $98.5 \pm 21.3$   $\mu$ M und damit deutlich höher als für den stationären Strom ( $5.6 \pm 0.4$   $\mu$ M im Photolyseexperiment). Diese Ergebnisse widersprechen vorhergehenden Messungen am nativen Austauscher scheinbar z.T. deutlich: Während übereinstimmend mit diesen Messungen eine Sättigung des Spitzenstroms und der Geschwindigkeitskonstante gefunden wurde, so zeigte sich bei Messungen am nativen Austauscher selbst bei einem Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationsprung auf 1.2  $\mu$ M noch ein transientes Stromsignal (Kappl et al., 2001). Ursache dieser starken Abweichungen ist allerdings vermutlich die Variation des freigesetzten Ca<sup>2+</sup> über die Laserenergie zur Photolyse, was zur Ausbildung einer Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationspitze führt (Zucker, 1993, siehe auch Material und Methoden), eine Problematik die auch Kappl et al. betonen. In der vorliegenden Arbeit wurden dagegen variierende DM-Nitrophen-Konzentrationen zwischen 50  $\mu$ M und 5.8 mM eingesetzt, um die freigesetzte Ca<sup>2+</sup>-Konzentration zu variieren. Damit konnte erstmals eine zuverlässige Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationsabhängigkeit der Austauscherkinetik durchgeführt werden. Dass sich bei niedrigen Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen kein transientes Stromsignal mehr ausbildet, wird auch von Messungen von Powell et al. (1993) bestätigt: Auch sie haben nach einem photolytischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationsprung auf 2–5  $\mu$ M nur ein exponentiell auf einen stationären Strom ansteigendes Stromsignal gemessen. Die von ihnen gemessene Zeitkonstante des Anstiegs mit  $\tau \approx 5$  ms stimmt gut mit den eigenen Messungen überein. Auch die deutlich niedrigere Ca<sup>2+</sup>-Affinität des Spitzenstroms und der Geschwindigkeitskonstanten des Signalabfalls macht bei näherer Betrachtung Sinn: Da die Na<sup>+</sup>-Translokation als geschwindigkeitsbestimmend angesehen wird (Niggli und Lederer, 1991a, Kappl und Hartung, 1996b), sollte die apparente Affinität des stationären Stroms im Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-Austausch deutlich höher sein als die intrinsische der Bindungsreaktion. Diese Unterschiede in den Ergebnissen verdeutlichen daher die Problematik der Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationspitze bei unzureichender Photolyseumsatz des DM-Nitrophen.

Die Untersuchungen zur Spannungsabhängigkeit des Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-Austauschs haben ergeben, dass das Membranpotential nur einen schwachen Einfluss auf den stationären Strom hat: Bei einer Änderung um 100 mV hat sich die Stromamplitude im untersuchten Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationsbereich nur um etwa den Faktor zwei geändert. Eine Anpassung der Strom-Spannungskennlinien mit der Gleichung  $I = I_0 \cdot \exp(-\frac{V_M e_0 \alpha}{2kT})$  gemäß der Eyring-Theorie für eine symmetrische Energiebarriere hat einen Dielektrizitätskoeffizienten  $\alpha$  von ca. 0.4 mit leichter Tendenz zur Abnahme bei niedrigen Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen ergeben. Matsuoka und Hilgemann (1992) haben vergleichbare Abhängigkeiten des stationären Stroms vom Membranpotential publiziert. Ebenso haben Niggli und Lederer (1991) einen Dielektrizitätskoeffizienten  $\alpha = 0.44$  gefunden. Dagegen haben Kappl et al. (2001) nur einen Dielektrizitätskoeffizienten  $\alpha = 0.19$  ermittelt. Die Ursache für diese Abweichung ist unklar.

Die Spannungsabhängigkeit des Spitzenstroms des vorstationären transienten Strom-

signals hat ein vergleichbares Verhalten gezeigt wie die des stationären Stroms: Der Dielektrizitätskoeffizient  $\alpha$  für die Spannungsabhängigkeit des Spitzenstrom lag bei 0.35 über den gesamten untersuchten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsbereich und ist damit vergleichbar zu dem für den stationären Strom ermittelten Wert (s.o). Der Signalabfall war dagegen spannungsunabhängig. Dies Ergebnis weicht damit deutlich von früheren Messungen am nativen Austauscher ab, da Kappl et al. (2001) eine Spannungsabhängigkeit des Signalabfalls und damit der Geschwindigkeitskonstanten  $1/\tau$  gefunden haben. Die Ursache dieser starken Diskrepanz ist unklar. Möglicherweise ist sie auf abweichende Versuchsbedingungen oder Unterschiede zwischen nativem und geklontem Austauscher zurückzuführen.

### 5.2.2 Messungen im $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch-Modus

Da im  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch unter stationären Bedingungen keine Nettoladung verschoben wird, ist er zum einen nur für Isotopen-Fluss-Messungen zugänglich (Blaustein und Russell, 1975, Bartschat und Lindenmayer, 1980, Slaughter et al., 1983). Zum anderen konnte gezeigt werden, dass der  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch elektrogene Schritte enthält und somit für Relaxationsmessungen zugänglich ist (Hilgemann, 1996, Kappl und Hartung, 1996b, He et al., 1998, Kappl et al., 2001).

Ebenso wie die Messungen im  $\text{Na}^{+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch so haben auch die Messungen im  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch gezeigt, dass das vorstationäre Stromsignal  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig ist. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit entspricht weitestgehend den Ergebnissen aus dem  $\text{Na}^{+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch: Sowohl der Spitzenstrom als auch die Geschwindigkeitskonstante des Signalabfalls sättigenden bei hohen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen. Die apparenten  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinitäten lagen bei  $57 \pm 10$  bzw.  $76 \pm 11 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ . Bedingt durch die Unsicherheiten bei der Abschätzung der freigesetzten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nach der Photolyse kann man davon ausgehen, dass diese Werte mit denen des  $\text{Na}^{+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschs übereinstimmen. Ebenso hat die Anpassung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten  $1/\tau_{\text{Abfall}}$  in beiden Transportmodi eine sehr ähnliche maximale Geschwindigkeitskonstante  $1/\tau_{\text{max}}$  von  $\approx 10000 \text{ s}^{-1}$  ergeben. Das heißt, auch die Geschwindigkeitskonstanten des Signalabfalls stimmen praktisch überein. Daher ist es naheliegend anzunehmen, dass beiden transienten Signalen die gleichen Reaktionsschritte zugrunde liegen. Vergleichende Literaturdaten zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit des Spitzenstroms und der Geschwindigkeitskonstanten existieren bisher nicht, da Kappl et al. (2001) aufgrund der Problematik der Ausbildung einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsspitze bei unzureichendem Photolyseumsatz keine apparenten  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinitäten bestimmen konnten.

Wie von Kappl et al. (2001) betont, sollte diese  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsspitze dagegen keinen Einfluss auf die verschobene Ladung (das heißt, dass Integral des transienten Stromsignals) haben. Dementsprechend stimmt die in der vorliegenden Arbeit gefundene weitestgehende  $\text{Ca}^{2+}$ -Unabhängigkeit der Ladungsverschiebung mit den  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationssprungmessungen am nativen Austauscher überein.

Auch die gefundene Spannungsunabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten des Signalabfalls im  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch bestätigt frühere Messungen (siehe Kappl et al., 2001).

Der von Kappl et al. gefundene Dielektrizitätskoeffizient  $2 \cdot \alpha$  von 0.38 im  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -

Austausch stimmt weitestgehend mit dem über die Spannungsabhängigkeit des Spitzenstroms bestimmten Wert von 0.22 überein. (Der Vorfaktor 2 vor dem  $\alpha$  dient zur Berücksichtigung des Faktors  $\frac{1}{2}$  im Exponenten der Gleichung  $I = I_0 \cdot \exp(-\frac{V_{Meo}\alpha}{2kT})$ .) Gleiches gilt für den von He et al. (1998) gefundenen Wert von  $\alpha = 0.46$ .

### 5.2.3 Transport anderer zweiwertiger Kationen und Einfluss der extrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration

Strontium und Barium sind als vom Austauscher transportierte Substrate bekannt (Blaustein und Santiago, 1977, Trospen und Philipson, 1983, Kimura et al., 1987, Trac et al., 1997, Condrescu et al., 1997). Allerdings gab es bisher keine Untersuchungen des Einflusses anderer zweiwertiger transportierter Kationen auf die Kinetik des Austauschers. Strommessungen wurden bisher nur unter stationären Bedingungen in der Anwesenheit von Na<sup>+</sup> auf der *trans*-Seite der Membran, bzw. es wurden Isotopen-Fluss-Messungen durchgeführt. Ein Vergleich mit Literaturdaten ist daher nicht möglich.

Da Sr<sup>2+</sup> als gut transportiertes Substrat gilt, war es insofern nicht verwunderlich, dass das vorstationäre Stromsignal nach einem Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationsprung im Sr<sup>2+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-Austausch das gleiche Verhalten gezeigt hat wie im Ca<sup>2+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-Austausch. Die Resultate können daher als Bestätigung der Ergebnisse im Ca<sup>2+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-Austausch gelten.

Überraschend waren dagegen die Ergebnisse im Ba<sup>2+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-Austausch, da Ba<sup>2+</sup> im Lösungswechselexperiment im Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-Austausch sich als sehr schlecht transportiertes Substrat herausgestellt hat (Trac et al., 1997). Dennoch hat sich im Photolyseexperiment ein vorstationäres Stromsignal ergeben, das von vergleichbarer Größe wie in Ca<sup>2+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-Austausch-Messungen war. Die Ladungsverschiebung lag sogar signifikant über der im Ca<sup>2+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-Austausch, wie ein t-Test bestätigt hat. Diese Ergebnisse sind insofern interessant, da Fujioka et al. (2000) bei der neuerlichen Bestimmung der Stöchiometrie des Austauschers 7 mM Ba<sup>2+</sup> zusätzlich zur Na<sup>+</sup>-Konzentration ihrer Pipettenlösung hinzugefügt haben, in der Annahme, diese Ba<sup>2+</sup>-Konzentration hätte keinen Einfluss auf den Austauscher. Die von ihnen gemessene 4:1-(Na<sup>+</sup>: Ca<sup>2+</sup>)-Stöchiometrie kann daher auch auf einen Ba<sup>2+</sup>-Effekt zurückzuführen sein.

Die beim Ba<sup>2+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-Austausch aufgetretene zweite, langsame Phase im Abklingen des transienten Stromsignals konnte bei früheren Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationsprungexperimenten am nativen Austauscher nicht beobachtet werden. Auch die von Hilgemann (1996) durchgeführten Spannungssprungexperimente haben bisher keinen Hinweis auf eine zusätzliche kinetische Phase geliefert. Da sie auch bei einer der Verringerung der extrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration auf 500 bzw. 100  $\mu$ M beobachtet werden konnte, könnte sie auf eine nun ratenlimitierende Bindungsreaktion zurückzuführen sein. Unter der Annahme, dass die Bindungsreaktion bei 5 mM Ba<sup>2+</sup> auf der extrazellulären Seite diffusionskontrolliert und sehr schnell ist, erscheint dies aber als alleinige Erklärung nicht ausreichend. Sie erklärt zumindest die beobachtete zusätzliche langsame Phase im Ca<sup>2+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-Austausch bei niedriger extrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Konzentration. Daher ist die zweite Abklingphase möglicherweise auf einen zusätzlichen elektrogenen Okklusionsschritt auf der extrazellulären Seite im Transportmodell zurückzuführen, der durch Ba<sup>2+</sup> beeinflusst (genauer: verlangsamt) wird.

Durch den intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung bei extrazellulärem  $\text{Ba}^{2+}$  konnte dieser Schritt dann erstmals beobachtet werden. Durch eine andere Zustandsverteilung vor dem Konzentrationsprung ist dann auch die deutlich höhere Ladungsverschiebung erklärbar. Die Bedeutung der Zustandsverteilung vor dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung zeigt sich auch beim Einfluss der freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration vor der Photolysereaktion. Nur durch eine Änderung der Zustandsverteilung ist die Umkehr der Spannungsabhängigkeit der Ladungsverschiebung zu verstehen. Nachfolgende Simulationen werden hier genaueren Aufschluss geben, da Literaturdaten zum Verständnis des vorstationären Stromsignals im  $\text{Ba}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch bisher nicht existieren.

#### 5.2.4 Spannungssprungexperimente im $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch

Spannungssprungexperimente im  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch-Modus mit hoher Zeitauflösung wurden zuerst von D. Hilgemann (1996) mit Hilfe eines modifizierten Patch-Clamp-Verstärkers durchgeführt. Die von Hilgemann gefundene Geschwindigkeitskonstante  $1/\tau$  stimmt größenordnungsmäßig mit der Geschwindigkeitskonstanten des Signalabfalls des transienten Stromsignals im Konzentrationsprungexperiment überein. Allerdings widerspricht die von Hilgemann (1996) gefundene Spannungsabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten den Ergebnissen aus den Konzentrationsprungexperimenten. Wie die selbst durchgeführten Spannungssprungexperimente gezeigt haben, zeigt die Geschwindigkeitskonstante möglicherweise tatsächlich eine Spannungsabhängigkeit. Allerdings können die Ergebnisse nicht als gesichert gelten, da sie sich nicht eindeutig reproduzieren ließen und, wie im Ergebnisteil erwähnt, sich auch bei Messungen an Kontrolloozyten transiente Ströme ergaben. Die bei den eigenen Spannungssprungmessungen in wenigen Fällen gefundene Spannungsabhängigkeit war zudem sehr schwach (Faktor  $\approx 2$  zwischen  $-200$  und  $+200$  mV Haltepotential) und widerspricht damit den Ergebnissen Hilgemanns (Faktor  $> 5$  zwischen  $-200$  und  $+200$  mV Haltepotential). Auf der anderen Seite wurde die Spannungsabhängigkeit auch bei Spannungssprungmessungen am NCX-SQ1 bestätigt (He et al., 1998). Hier sind daher weitere Untersuchungen notwendig, um diese Diskrepanzen zu klären, was im Rahmen dieser Arbeit leider nicht möglich war.

#### 5.2.5 Folgerungen für ein Reaktionsmodell

Die Resultate aus den Messungen der vorstationären Ströme erlauben wichtige Rückschlüsse auf ein Reaktionsmodell. Da der Halbzyklus des  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschs weniger Reaktionsschritte enthält als der gesamte Zyklus des  $\text{Na}^{+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschs, soll zunächst ein Reaktionsmodell für den  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch aufgestellt werden. Die Größenordnung der Ratenkonstanten soll dabei, soweit möglich, aus den Messungen abgeleitet werden, und dann durch die Anpassung an typische Stromsignale mit Hilfe der Scientist-Software genauer bestimmt werden. Hierzu wird wieder, wie bereits bei der Diskussion der Resultate der  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanäle gezeigt, ein Satz gekoppelter Differentialgleichungen gemäß dem Reaktionsmodell aufgestellt werden und über die Scientist-Software numerisch integriert. Das Reaktionsmodell soll dann auf den vollen Zyklus des  $\text{Na}^{+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschs erweitert werden. Eine Simulation des  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschs und

des  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschs soll die in den Messungen gefundenen Resultate bestmöglich qualitativ und quantitativ reproduzieren.

### Folgerungen aus dem $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch

Die wichtigsten Resultate aus den Messungen im  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch, die z.T. auch schon von früheren Messungen am nativen Austauscher bekannt sind, und die Folgerungen für ein Reaktionsmodell sollen zunächst noch einmal zusammengefasst werden:

- Ein intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung ergibt ein transientes Einwärtsstromsignal. Die zwei negativen Ladungen des  $\text{Ca}^{2+}$  müssen daher durch negative Ladungen des Austauschers überkompensiert werden. Niggli und Lederer (1991) und Kappl und Hartung (1996b) gehen daher von ca. 2.5 negativen Ladungen, die das Protein trägt, aus.
- Der Signalanstieg kann bei hohen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprüngen messtechnisch nicht aufgelöst werden: Die Zeitkonstante des Signalanstiegs liegt unter  $50 \mu\text{s}$ . Der Signalabfall im  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch lässt sich mit einer monoexponentiellen Funktion anpassen. Sofern im Signalanstieg nicht mehrere Phasen verborgen sind, muss ein Reaktionsmodell für ein biphasisches Verhalten mindestens drei Zustände aufweisen. Geht man von je einer intrazellulären bzw. extrazellulären Bindungs-/Dissoziationsreaktion sowie mindestens einem Translokationsschritt aus, so muss ein minimales Reaktionsmodell für den  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch mindestens vier Zustände aufweisen.
- Das transiente Signal ist  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig: Der Spitzenstrom nimmt bei abnehmender  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ab, die Geschwindigkeitskonstante  $1/\tau_{\text{Abfall}}$  des Signalabfalls wird kleiner. Sowohl der Spitzenstrom als auch die Geschwindigkeitskonstante des Signalabfalls sättigen aber bei hohen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung kann daher nicht elektrogen sein, da sonst ein linearer Anstieg des Signals mit steigender  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu erwarten wäre. Um eine Sättigung zu erreichen, muss ein nachfolgender Reaktionsschritt ratenlimitierend sein.
- Die Geschwindigkeitskonstante des Signalabfalls ist im gesamten getesteten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsbereich spannungsunabhängig. Die Amplitude des transienten Stromsignals und damit die verschobene Ladung ist aber spannungsabhängig: Bei depolarisierenden Membranpotentialen ist die Ladungsverschiebung geringer als bei hyperpolarisierenden Membranpotentialen. Der der Bindung nachfolgende ratenlimitierende Reaktionsschritt kann daher nicht elektrogen sein, da unter diesen Umständen eine spannungsabhängige Geschwindigkeitskonstante im Signal auftreten müsste. Der elektrogene Schritt folgt deshalb wahrscheinlich dem nichtelektrogenen, ratenlimitierenden Schritt nach der  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung.
- Zudem hat sich auch bei niedrigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprüngen ( $<10 \mu\text{M}$ ) die Geschwindigkeitskonstante des Signalabfalls als spannungsunabhängig erwiesen. Mit der Annahme, dass bei niedrigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung ratenlimitierend wird und die Geschwindigkeitskonstante des Signalabfalls bestimmt,

deutet diese Spannungsunabhängigkeit ebenfalls auf eine nicht-elektrogene Bindung hin.

- Die verschobene Ladung, das heißt, das Integral des transienten Stromsignals ist nahezu unabhängig von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nach der Photolyse. Die Einstellung des Gleichgewichtszustands nach dem intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung ist also praktisch von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration entkoppelt. Dies deutet darauf hin, dass der elektrogene Schritt, der dem ratenlimitierenden Schritt folgt, sehr hohe Hin- und Rückraten besitzt und im wesentlichen für die Einstellung des Gleichgewichtszustands verantwortlich ist.
- Denkbar wäre daher ein 4-Zustandsmodell, bei dem dann allerdings die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung/-Dissoziation auf der extrazellulären Seite elektrogen sein müsste. Eine Spannungsabhängigkeit der  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung auf der extrazellulären Seite ist nach Matsuo-ka und Hilgemann (1992) aber eher unwahrscheinlich.

Demnach muss das Reaktionsmodell aus mindestens fünf Zuständen bestehen:

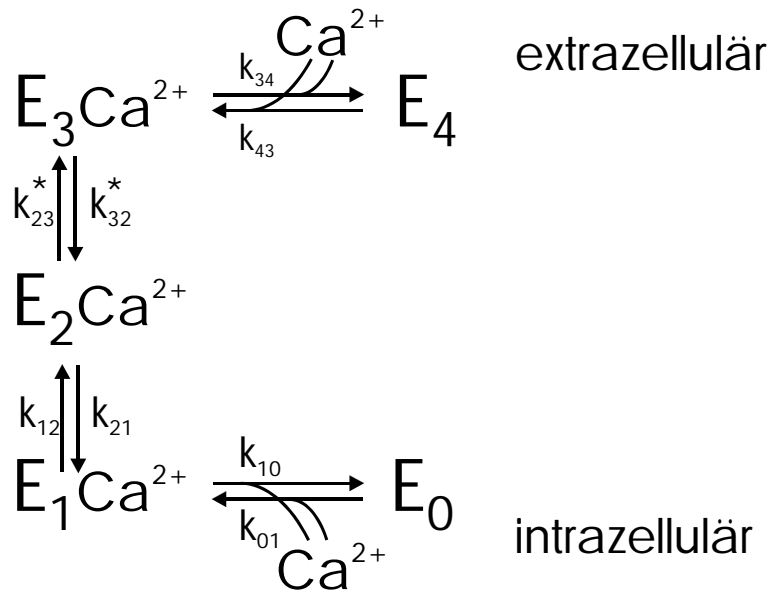


Abbildung 5.4: Reaktionsschema des  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschs mit 5 Zuständen

Schritt  $E_2 \rightleftharpoons E_3$  ist elektrogen (mit \* gekennzeichnete Raten)

Ein 5-Zustandsmodell wurde bereits von Kappl et al. (2001) vorgeschlagen. Mit der in dieser Arbeit vorliegenden detaillierteren  $\text{Ca}^{2+}$ - und Spannungsabhängigkeit des vorstationären Stroms soll dieses 5-Zustandsmodell für den  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch verfeinert werden.

Nach der obigen Analyse kann man von einer schnellen  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsreaktion ausgehen. Eine schnelle Bindung, die nahe an der Grenze diffusionskontrollierter Reaktionen ( $\approx 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) ist, wurde von P. Läger (1987) angenommen. Dass dies tatsächlich der Fall ist, hat die Analyse der  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit des transienten Stromsignals im  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch gezeigt. Bei niedrigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprüngen ist das transiente

Signal in ein biexponentiell auf den stationären Strom ansteigendes Signal übergegangen. Unter der Annahme, dass bei niedrigen Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen die Ca<sup>2+</sup>-Bindung ratenlimitierend wird, lässt sich die Ca<sup>2+</sup>-Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten der langsamen Phase mit einer Regressionsgeraden anpassen, deren Steigung die Ca<sup>2+</sup>-Bindungsrate widerspiegelt. Die Ca<sup>2+</sup>-unabhängige Bindungsrate  $k_{01}$  liegt demnach bei ca.  $5 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  und damit tatsächlich in der Größenordnung diffusionskontrollierter Reaktionen.

Wenn der Ca<sup>2+</sup>-Bindungs-/Dissoziationsschritt  $E_0 \xrightleftharpoons{\text{Ca}^{2+}} E_1$  von einem stark ratenlimitierenden Konformationsänderungsschritt  $E_1 \rightleftharpoons E_2$  gefolgt wird, dann sollten beide Schritte im schnellen Vergleichsgewicht liegen. Die Rate  $k_{12}$  des Übergangs von  $E_1$  nach  $E_2$  muss dann durch eine Rate  $\tilde{k}_{12}$  ersetzt werden, für die gilt:

$$\tilde{k}_{12} = k_{12} \cdot \left( 1 + \frac{K_D^{\text{intr.}}}{[\text{Ca}^{2+}]_{\text{intr.}}} \right)^{-1} \quad (5.8)$$

Ebenso wird die Rückrate  $k_{21}$  durch die nachfolgenden Reaktionen, das heißt, durch den elektrogenen Schritt und der Ca<sup>2+</sup>-Bindung/Dissoziation auf der extrazellulären Seite, beeinflusst und lässt sich durch eine Rate  $\tilde{k}_{21}$  ersetzen (unter der Voraussetzung, dass die Reaktionen schnell sind):

$$\tilde{k}_{21} = k_{21} \cdot \left( 1 + \frac{k_{23}}{k_{32}} \cdot \left( 1 + \frac{K_D^{\text{extr.}}}{[\text{Ca}^{2+}]_{\text{extr.}}} \right) \right)^{-1} \quad (5.9)$$

Eine im gemessenen Stromsignal zu erwartende Geschwindigkeitskonstante

$$1/\tau = \tilde{k}_{12} + \tilde{k}_{21} \quad (5.10)$$

sollte dann über die Rate  $\tilde{k}_{12}$  ein von der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration abhängiges Verhalten zeigen. Die Rate  $\tilde{k}_{21}$  wird als konstant angenommen, da die extrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration nicht variiert wurde. Zudem sollte die extrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration von 5 mM größer sein als der  $K_D^{\text{extr.}}$ -Wert, zieht man ersatzweise die apparente Ca<sup>2+</sup>-Affinität von  $K_{0.5} = 0.1$  bis 1.4 mM (Blaustein und Lederer, 1999) zur Abschätzung des  $K_D^{\text{extr.}}$ -Werts heran. Unter der Annahme, dass  $k_{23} \approx k_{32}$ , würde  $\tilde{k}_{21}$  dann näherungsweise  $0.5 \cdot k_{21}$  sein.

Es ist daher anzunehmen, dass der Signalabfall des transienten Signals im Ca<sup>2+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-Austausch diese Geschwindigkeitskonstante  $1/\tau = \tilde{k}_{12} + \tilde{k}_{21}$  reflektiert, während der Ca<sup>2+</sup>-Bindungs-/Dissoziationsschritt so schnell ist, dass er in dem messtechnisch nicht auflösbaren Signalanstieg liegt. Danach würde die bei der Anpassung der experimentellen Daten mit einer Michaelis-Menten-Funktion bestimmte Ca<sup>2+</sup>-Affinität der Geschwindigkeitskonstanten von  $\approx 100 \text{ }\mu\text{M}$  die Dissoziationskonstante  $K_D^{\text{intr.}} = k_{01}/k_{10}$  der Bindungs-/Dissoziationsreaktion widerspiegeln. Da die Rate  $k_{01}$  bereits zu  $5 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  bestimmt wurde (s.o.), muss die Dissoziationsrate  $k_{10}$  dann  $50000 \text{ s}^{-1}$  betragen. Bei sättigenden Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen sollte die über die Michaelis-Menten-Kinetik bestimmte maximale Geschwindigkeitskonstante  $(1/\tau)_{\text{max}}$  hauptsächlich durch die Rate  $k_{12}$  bestimmt werden. Eine genauere Betrachtung der experimentellen Daten deutet zudem darauf hin, dass bei niedrigen Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen die Anpassung mit einer Michaelis-Menten-Funktion

nicht optimal ist, da eine korrekte Anpassung der Daten einen Ordinatenschnittpunkt  $> 0$  ergeben sollte (vgl. z.B. Abb. 4.18B auf Seite 82). Dieser Y-Achsenschnittpunkt bei ca.  $500 \text{ s}^{-1}$  sollte nach obiger Analyse der Rate  $\tilde{k}_{21} \approx 0.5 \cdot k_{21}$  entsprechen, sodass die Raten  $k_{12}$  und  $k_{21}$  mit ca.  $10000$  und  $1000 \text{ s}^{-1}$  eine starke Asymmetrie aufweisen würden.

Für den Bindungs-/Dissoziationsschritt auf der extrazellulären Seite fehlen vergleichbare experimentelle Daten. Daher soll zunächst angenommen werden, dass die Bindung auf der extrazellulären ebenfalls diffusionskontrolliert ist. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsrate  $k_{43}$  wäre demnach auch mit mindestens  $5 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  anzusetzen. Im Lösungswechselexperiment zum  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch wurde eine deutlich niedrigere apparente  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität für die extrazelluläre Bindungsstelle bestimmt als für die intrazelluläre ( $K_M = 320 \text{ }\mu\text{M}$  bei  $80 \text{ mM Na}^+$  intrazellulär, Matsuoka und Hilgemann, 1992). Daher ist die Dissoziationsrate  $k_{34}$  wahrscheinlich deutlich größer als die Dissoziationsrate  $k_{10}$  der  $\text{Ca}^{2+}$ -Dissoziation auf der intrazellulären Seite. Bei der eingesetzten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von  $5 \text{ mM}$  auf der extrazellulären Seite sollte der Bindungs-/Dissoziationsschritt unter diesen Annahmen daher nicht ratenlimitierend wirken.

Mit den obigen Annahmen lässt sich bereits ein Teil der notwendigen Parameter einer Simulation des Austauschsignals gemäß dem Schema 5.4 vorgeben. Zur Simulation wird das folgende Differentialgleichungssystem mit Hilfe der *Scientist*-Software numerisch integriert und über einen Multivariationsfit an gemessene vorstationäre Austauschersignale bei verschiedenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprüngen und Membranpotentialen angepasst. Die gleichzeitige Variation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und des Membranpotentials bei der numerischen Integration erlaubt eine genauere Bestimmung der Parameter, da das aufgestellte Differentialgleichungssystem ansonsten zu stark überparametrisiert wäre.

$$\begin{aligned}
 \frac{d}{dt}[E_0] &= -k_{01} \cdot [\text{Ca}^{2+}]_{\text{intr.}} \cdot [E_0] + k_{01} \cdot K_{D,\text{intr.}}^{\text{Ca}^{2+}} \cdot [E_1] \\
 \frac{d}{dt}[E_1] &= -(k_{01} \cdot K_{D,\text{intr.}}^{\text{Ca}^{2+}} + k_{12}) \cdot [E_1] + k_{01} \cdot [\text{Ca}^{2+}]_{\text{intr.}} \cdot [E_0] + k_{21} \cdot [E_2] \\
 \frac{d}{dt}[E_2] &= -(k_{23}^0 \cdot e^{-\left(\frac{V_M e_0 \alpha}{2kT}\right)} + k_{21}) \cdot [E_2] + k_{12} \cdot [E_1] + k_{32}^0 \cdot e^{\left(\frac{V_M e_0 \alpha}{2kT}\right)} \cdot [E_3] \\
 \frac{d}{dt}[E_3] &= -(k_{43} \cdot K_{D,\text{extr.}}^{\text{Ca}^{2+}} + k_{32}^0 \cdot e^{\left(\frac{V_M e_0 \alpha}{2kT}\right)}) \cdot [E_3] + k_{23}^0 \cdot e^{-\left(\frac{V_M e_0 \alpha}{2kT}\right)} \cdot [E_2] \\
 &\quad + k_{43} \cdot [\text{Ca}^{2+}]_{\text{extr.}} \cdot [E_4] \\
 \frac{d}{dt}[E_4] &= -k_{43} \cdot [\text{Ca}^{2+}]_{\text{extr.}} \cdot [E_4] + k_{43} \cdot K_{D,\text{extr.}}^{\text{Ca}^{2+}} \cdot [E_3]
 \end{aligned}$$

Das Stromsignal wird über die Gleichung

$$I = J \cdot e_0 \cdot \left( \alpha \cdot k_{32}^0 \cdot e^{\left(\frac{V_M e_0 \alpha}{2kT}\right)} \cdot [E_3] - \alpha \cdot k_{23}^0 \cdot e^{-\left(\frac{V_M e_0 \alpha}{2kT}\right)} \cdot [E_2] \right),$$

dem Nettoladungsfluss über den elektrogenen Schritt, ermittelt. Der Vorfaktor  $J$  stellt einen Skalierungsfaktor dar, um eine Anpassung des simulierten Stromsignals an ein gemessenes Signal zu ermöglichen. Die Anfangsverteilung auf die Zustände  $[E_0]$  bis  $[E_4]$  wird über die Gleichgewichtskonstanten  $K = k_{\text{rück}}/k_{\text{hin}}$  des jeweiligen Reaktionsschritts und den anfänglichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen auf beiden Membranseiten mit der Randbedin-



gung

$$\sum_i [E_i] = 1$$

vorgegeben. Dies ist insbesondere für die spätere Simulation des Ba<sup>2+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-Austauschs notwendig, wo nicht davon ausgegangen werden kann, dass sich vor dem intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationsprung alle Transporter im Zustand  $[E_0]$  befinden.

Die Raten  $k_{23}$  und  $k_{32}$  repräsentieren den elektrogenen Schritt und wurden daher spannungsabhängig gemacht, indem sie durch eine Rate  $k_{23}^0$  bzw.  $k_{32}^0$  (Rate bei 0 mV) multipliziert mit dem Exponentialfaktor  $\exp\left(\pm \frac{V_M e_0 \alpha}{2kT}\right)$  ersetzt wurden. Für  $\alpha$  wird bei der numerischen Integration ein Wert von 0.22 vorgegeben, wie er im Experimententeil bei der Spannungsabhängigkeit des Spitzenstroms im Ca<sup>2+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-Austausch bestimmt wurde. Da die Spannungsabhängigkeit des Spitzenstroms über die (spannungsunabhängige) Geschwindigkeitskonstante  $1/\tau$  direkt an die Spannungsabhängigkeit der verschoben Ladung (dem Integral des transienten Signals) gekoppelt ist, sollte dies gerechtfertigt sein.

Die Rate  $k_{10}$  wurde über die Gleichung  $K_{D.intr.}^{Ca^{2+}} = k_{10}/k_{01}$  ersetzt, wobei für  $K_{D.intr.}^{Ca^{2+}}$  ein Wert von 100  $\mu\text{M}$  angenommen wird (s.o.). Gleiches gilt für die Rate  $k_{34}$ . Da hier die Ca<sup>2+</sup>-Dissoziationskonstante nicht genau bekannt ist, wird ersatzweise der aus Lösungswechselexperimenten bestimmte apparente  $K_M$ -Wert von  $\approx 300 \mu\text{M}$  Ca<sup>2+</sup> genommen. Für die Ca<sup>2+</sup>-Bindung auf beiden Membranseiten (Raten  $k_{01}$  und  $k_{43}$ ) wird zunächst ein Wert von  $5 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  vorgegeben (s.o.).

Damit bleiben die Raten  $k_{12}$ ,  $k_{21}$ ,  $k_{23}^0$  und  $k_{32}^0$  als freie Parameter über. Eine testweise numerische Integration des Differentialgleichungssystems mit einer *least-square*-Anpassung an gemessene Stromsignale zur Abschätzung der Größenordnung und besten Startwerte der Parameter hat ergeben, dass die Rate  $k_{12}$  tatsächlich deutlich größer sein muss als die Rate  $k_{21}$ , wie es nach der obigen Analyse zu erwarten war. Dies wurde ebenso von Kappl et al. (2001) gefunden. Gemäß Gleichung 5.8 bis 5.10 sollte in diesem Fall die Rate  $k_{12}$  näherungsweise der Geschwindigkeitskonstanten  $1/\tau$  des Signalabfalls bei sättigendem Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationsprung auf der intrazellulären Seite entsprechen (s.o.). Daher wird die Rate  $k_{12}$  auf den im Experimententeil über die Michaelis-Menten-Funktion bestimmten Wert der maximalen Geschwindigkeitskonstanten  $(1/\tau)_{max}$  von  $\approx 10000 \text{ s}^{-1}$  festgesetzt, während der Parameter  $k_{21}$  zwar variiert, aber als Startwert  $\approx 1000 \text{ s}^{-1}$  vorgegeben wird, um eine bessere Konvergenz des Integrationsalgorithmus zu erreichen.

In Tabelle 5.2 sind die Fitparameter für verschiedene Simulationen zusammengefasst. Es wurden für die Simulationen ein Teil der Parameter gemäß der obigen Analyse fest vorgegeben, aber zur Kontrolle auch abweichende Werte für die Ca<sup>2+</sup>-Bindungsraten  $k_{01}$  und  $k_{43}$  sowie für die Rate  $k_{12}$  getestet.

Fit Nr. 1 und 2 unterscheiden sich in der Vorgabe der Ca<sup>2+</sup>-Bindungsrate ( $5 \cdot 10^8$  vs.  $2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). Beide Fits spiegeln die experimentellen Daten im Wesentlichen wider, zumal die Fitparameter nicht deutlich voneinander abweichen. Fit Nr. 2 zeigt aber eine Tendenz, nach der die apparente Ca<sup>2+</sup>-Affinität des Spitzenstroms ( $K_M = 75 \mu\text{M}$ ) kleiner ist als die der Geschwindigkeitskonstanten  $1/\tau$  ( $K_M = 88 \mu\text{M}$ ). Dieses Verhalten passt besser zu den experimentellen Daten ( $57 \pm 10$  vs.  $76 \pm 11 \mu\text{M}$  Ca<sup>2+</sup>). Beim Fit Nr. 3, 4 und 5 wurde testweise die Rate  $k_{12}$  auf  $5000 \text{ s}^{-1}$  festgesetzt; beim Fit Nr. 5 zusätzlich  $\alpha=0.44$

gesetzt, da Kappl et al. (2001) von einer stärkeren Spannungsabhängigkeit ausgehen. Unter der Bedingung, dass  $K_{D,intr}^{Ca^{2+}}$  ca.  $100 \mu\text{M}$  sein soll, zeigen diese Anpassungen aber nur eine sehr schlecht Übereinstimmung mit den experimentellen Daten. Eine Anpassung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten  $1/\tau$  mit einer Hill-Funktion ist bei einem Hill-Koeffizienten von  $n = 1$  nur schlecht möglich. Die maximale Geschwindigkeitskonstante  $(1/\tau)_{max}$  liegt zudem bei ca.  $5000 \text{ s}^{-1}$  statt bei ca.  $10000 \text{ s}^{-1}$ . Dies spricht für die obige Analyse, nach der  $(1/\tau)_{max}$  hauptsächlich durch die Rate  $k_{12}$  beeinflusst wird. Sie muss daher auf  $\approx 10000 \text{ s}^{-1}$  festgelegt werden.

Beim Fit Nr. 6 wurde abweichend von allen anderen Anpassungen die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsrate auf der extrazellulären Seite auf nur  $2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  festgesetzt. Dies widerspricht zwar der Annahme, dass die Bindungsreaktionen auf beiden Membranseiten diffusionskontrolliert sind und damit in der Größenordnung  $\approx 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  liegen (Läuger, 1987). Der Grund für diese Festlegung der Bindungsrate wird aber später bei der Analyse des vorstationären Stromsignals im  $\text{Ba}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch deutlich werden. Da sich die gewonnenen Fitparameter nicht deutlich von denen der Fits Nr. 1 und 2 unterscheiden, erfüllt auch Fit Nr. 6 die experimentell gewonnenen Rahmenbedingungen befriedigend.

Allen drei Anpassungen (Fit Nr. 1, 2 und 6) ist gemeinsam, dass die Rate  $k_{21}$  deutlich kleiner sein muss als die Rate  $k_{12}$ , die auf  $10000 \text{ s}^{-1}$  festgesetzt wurde. Die Anpassungen haben aber gezeigt, dass sie dennoch größer sein muss als der von Kappl et al. (2001) vorgeschlagene Wert von nur  $50 \text{ s}^{-1}$ : Bei Vorgabe sehr niedriger Startwerte  $\leq 100 \text{ s}^{-1}$  ergaben sich immer wieder Werte um ca.  $1000 \text{ s}^{-1}$ . Die dem elektrogenen Schritt zugeordneten Raten  $k_{23}$  und  $k_{32}$  sind nach den Anpassungen deutlich größer als die des vorausgehenden, als geschwindigkeitsbestimmend postulierten Schritts. Dies hat sich allein durch die Anpassung an die experimentellen Daten ergeben, ohne dass dies als Randbedingung für den *least-square*-Algorithmus vorgegeben worden ist. Die Rate  $k_{23}$  ist nach den Anpassungen mit  $15000\text{--}20000 \text{ s}^{-1}$  kleiner als die Rückrate  $k_{32}$  mit  $25000\text{--}30000 \text{ s}^{-1}$ .

Ein Vergleich der simulierten Stromsignale mit experimentellen Signalen nach einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung auf 20, 77 und  $500 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  bei 0 mV Membranpotential zeigt Abbildung 5.5 A bis C. Zur Simulation wurden die Parameter des Fits Nr. 2, der die beste Übereinstimmung mit den experimentell gefundenen Daten gezeigt hat, genommen. Die simulierten Signale zeigen eine recht gute Übereinstimmung mit den experimentellen Daten. Da beim Fit Nr. 2 die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsrate auf  $2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  festgesetzt wurde, stellt sich die Frage, inwieweit dies mit dem aus den experimentellen Daten abgeschätzten Wert von  $5 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  vereinbar ist. Die Größenordnung beider Werte stimmt aber prinzipiell überein, sodass  $5 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  als untere Grenze für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsrate angesehen werden kann und die tatsächliche Rate daher durchaus höher liegen kann. Hier gilt insbesondere zu berücksichtigen, dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung bei der Photolyse von DM-Nitrophen nicht unendlich schnell erfolgt, sondern mit einer Rate von mindestens  $38000 \text{ s}^{-1}$  (Ellis-Davies et al., 1996).

Die Parameter des Fits Nummer 2 wurden desweiteren für eine vollständige Simulation des vorstationären Stromsignals mit dem 5-Zustandsmodell herangezogen. Die simulierten Stromsignale bei verschiedenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprüngen und Membranpotentialen und die sich daraus ergebenden Daten sind in der Abbildung 5.6 A bis F dargestellt:

Parameter	Fit 1	Fit 2	Fit 3	Fit 4	Fit 5	Fit 6	Anmerkung
$k_{01}$	$5 \cdot 10^8$	$2 \cdot 10^9$	$2 \cdot 10^9$	$5 \cdot 10^8$	$2 \cdot 10^9$	$5 \cdot 10^8$	Parameter fest
$k_{10}$	50000	200000	200000	50000	200000	50000	über $K_{D, \text{intr.}}^{Ca^{2+}} = 100 \mu M$
$k_{12}$	10000	10000	5000	5000	5000	10000	Parameter fest
$k_{21}$	992	766	3617	4014	6018	1158	
$k_{23}$	19720	15884	29045	35475	40718	19655	
$k_{32}$	30037	25204	32110	41061	14701	28206	
$k_{34}$	150000	600000	600000	150000	600000	150000	über $K_{M, \text{extr.}}^{Ca^{2+}} = 300 \mu M$
$k_{43}$	$5 \cdot 10^8$	$2 \cdot 10^9$	$2 \cdot 10^9$	$5 \cdot 10^8$	$2 \cdot 10^9$	$2 \cdot 10^6$	Parameter fest
$\alpha$	0.22	0.22	0.22	0.22	0.44	0.22	Parameter fest
$[Ca^{2+}]_{\text{extr.}}$	5	5	5	5	5	5	Parameter fest
$[Ca^{2+}]_{\text{intr.}}$	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	$[Ca^{2+}]_{\text{intr.}}$ vor Photolyse
$K_{M,1/\tau}^{Ca^{2+}}$	89	88	24	23	28	83	Fit 3 und 4: Anpassung mit
$(1/\tau)_{\text{max}}$	10700	10300	5800	6000	5300	9860	Michaelis-Menten-Fkt. schlecht
$K_{M, \text{Spitze}}^{Ca^{2+}}$	88	75	90	99	83	88	
$\tau_{\text{Anstieg}}$	21–30	25–26	13–25	18–21	24–37	26–28	$[Ca^{2+}]_{P_{\text{hot.}}}$ 500–10 $\mu M$
Spannungsabhängigkeit $\tau_{\text{Abfall}}$	nein	nein	ja	schwach	ja	nein	

Tabelle 5.2: Fitparameter der Simulationen des 5-Zustandsmodells zum  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch

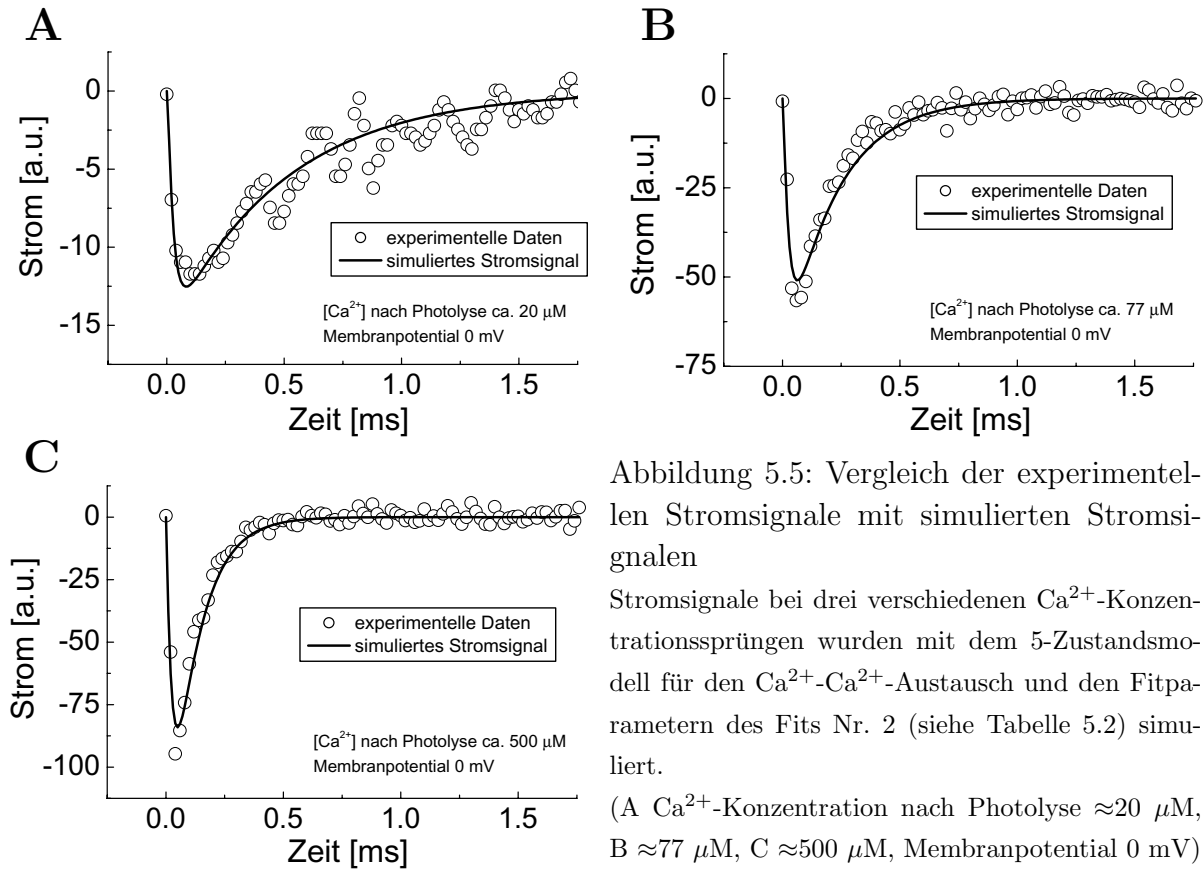


Abbildung 5.5: Vergleich der experimentellen Stromsignale mit simulierten Stromsignalen

Stromsignale bei drei verschiedenen  $Ca^{2+}$ -Konzentrationsprüngen wurden mit dem 5-Zustandsmodell für den  $Ca^{2+}$ - $Ca^{2+}$ -Austausch und den Fitparametern des Fits Nr. 2 (siehe Tabelle 5.2) simuliert.

(A  $Ca^{2+}$ -Konzentration nach Photolyse  $\approx 20 \mu M$ , B  $\approx 77 \mu M$ , C  $\approx 500 \mu M$ , Membranpotential 0 mV)

Die Auswertung simulierter  $Ca^{2+}$ -Konzentrationsprünge in (A) ergibt eine apparente  $Ca^{2+}$ -Affinität der Geschwindigkeitskonstanten  $1/\tau$  des Signalabfalls von  $88 \pm 3 \mu M$   $Ca^{2+}$  und eine maximale Geschwindigkeitskonstante  $(1/\tau)_{max}$  von  $10280 \pm 100 s^{-1}$ . Die Anpassung der  $Ca^{2+}$ -Abhängigkeit des Spitzenstroms mit einer Michaelis-Menten-Funktion, dargestellt in (C), ergibt eine apparente  $Ca^{2+}$ -Affinität von  $74.5 \pm 0.5 \mu M$   $Ca^{2+}$ . Das simulierte Stromsignal zeigt wie die experimentellen Daten eine Abnahme bei depolarisierenden Potentialen (D). Zusätzlich ist in (D) das simulierte Stromsignal bei einem Membranpotential von +100 mV auf das bei -100 mV normiert worden, um so die Spannungsunabhängigkeit des Signalabfalls zu verdeutlichen. Entsprechend der Signalabnahme bei depolarisierenden Membranpotentialen nimmt die Ladungsverschiebung ab (E). Die Geschwindigkeitskonstante  $1/\tau$  des Signalabfalls zeigt die aus den experimentellen Daten gewonnene typische Spannungsunabhängigkeit, aber  $Ca^{2+}$ -Abhängigkeit. Damit zeigt ein mit dem 5-Zustandsmodell und den Parametern des Fits Nr. 2 (siehe Tabelle 5.2) simulierter vorstationärer Austauscherstrom im  $Ca^{2+}$ - $Ca^{2+}$ -Austausch im Wesentlichen alle aus den experimentellen Daten bekannten Eigenheiten. Lediglich die apparente  $Ca^{2+}$ -Affinität des Spitzenstroms sollte höher sein und weicht damit ein wenig von den experimentellen Daten ab.

In Abbildung 5.6 A bis C ist die Verteilung der Transporter auf die Zustände  $[E_0]$  bis  $[E_4]$  vor und nach einem  $Ca^{2+}$ -Konzentrationsprung dargestellt. Bei den Simulationen wurde von einer freien  $Ca^{2+}$ -Konzentration vor der Photolyse (Zeitpunkt  $t=0$  ms) von

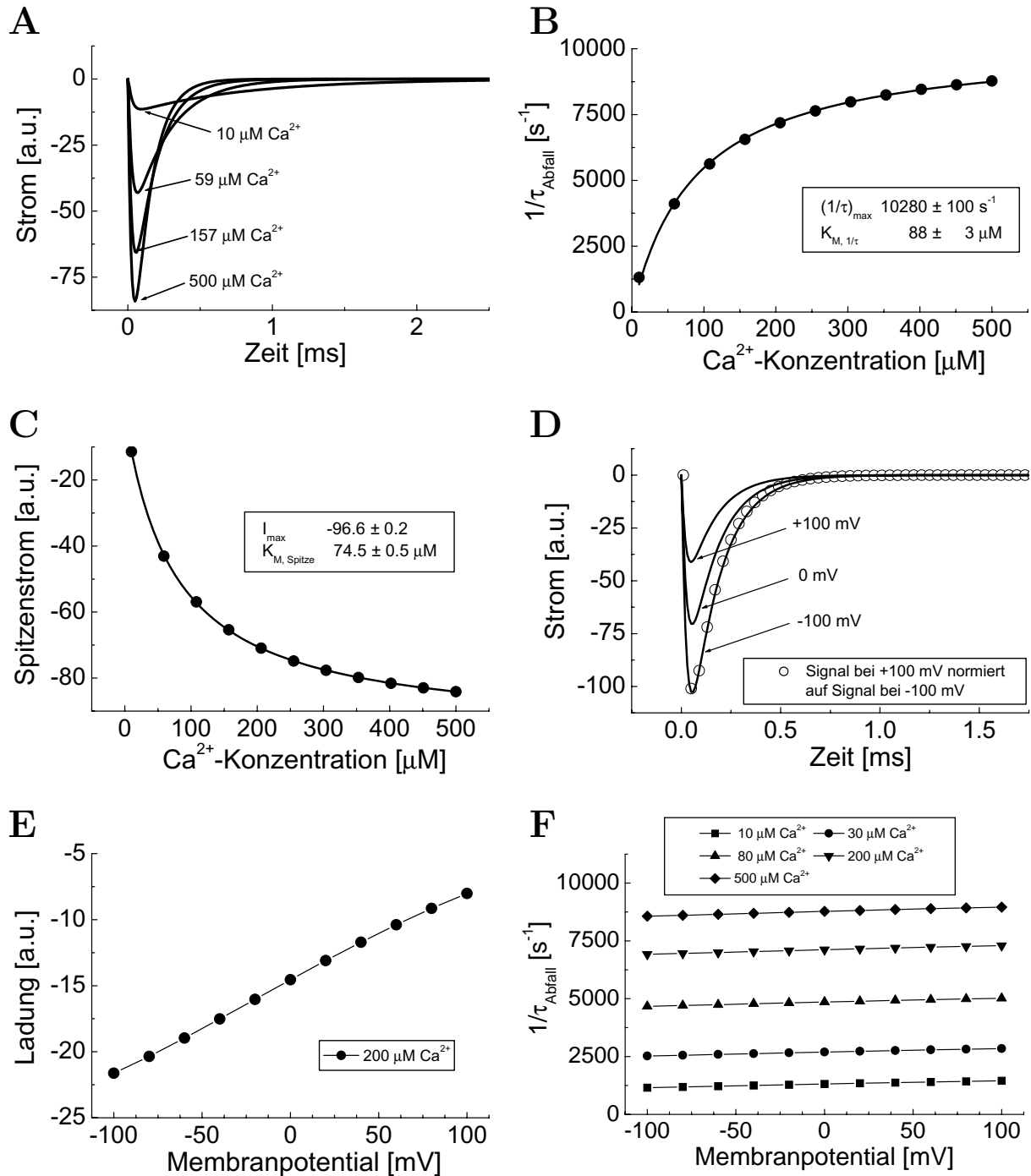


Abbildung 5.6: Simulation des vorstationären Stromsignals mit dem 5-Zustandsmodell

Zur Simulation wurden die Parametern des Fits Nr. 2 (siehe Tabelle 5.2) genommen.

A Simulation verschiedener  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrations sprünge, B  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten  $1/\tau$ : eine Anpassung mit einer Michaelis-Menten-Funktion ergibt einen  $K_M$ -Wert von  $88 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  und ein  $(1/\tau)_{\max}$  von  $10280 \text{ s}^{-1}$ , C  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit des Spitzenstroms,  $K_{M, \text{Spitze}} = 75 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ , D Simulation der Spannungsabhängigkeit bei einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrations sprung auf  $200 \mu\text{M}$ , das Signal bei  $+100 \text{ mV}$  Membranpotential wurde zusätzlich auf das Signal bei  $-100 \text{ mV}$  normiert und verdeutlicht die Spannungsunabhängigkeit des Signalabfalls, E Spannungsabhängigkeit der verschobenen Ladung des Signals aus D, F  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit, aber Spannungsunabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten  $1/\tau$  des Signalabfalls

Das simulierte Stromsignal zeigt im Wesentlichen das in den experimentellen Daten gesehene Verhalten.

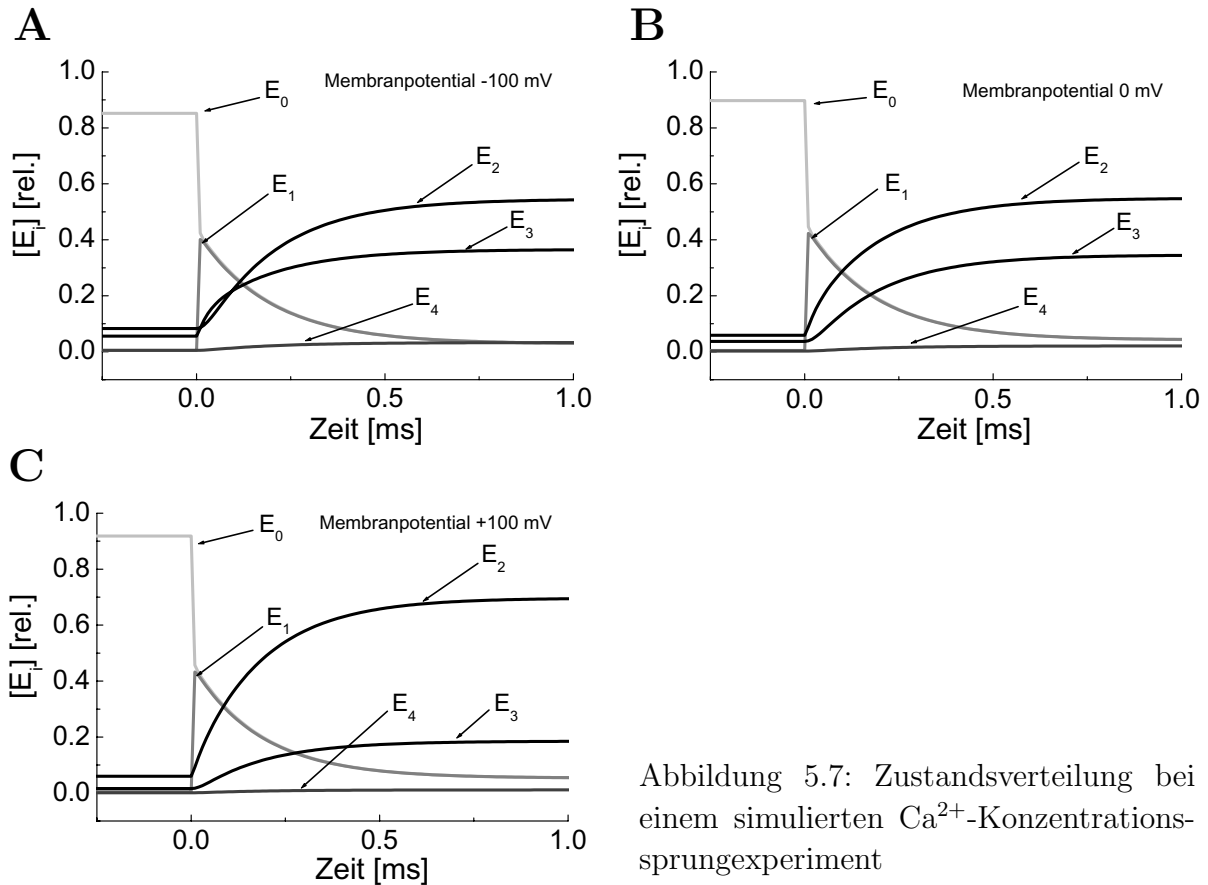


Abbildung 5.7: Zustandsverteilung bei einem simulierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprungexperiment

Verteilung der Transporter auf die Zustände  $[E_0]$  bis  $[E_4]$  vor und nach einem simulierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung ( $t=0$  ms) auf  $100 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  bei  $-100$  mV (A),  $0$  mV (B) und  $+100$  mV (C) Membranpotential. Bei einer intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von  $0.5 \mu\text{M}$  vor der Photolyse sind ca. 90% der Transporter im Zustand  $[E_0]$ .

(5-Zustandsmodell für den  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch mit den Parametern des Fits Nr. 2 (siehe Tabelle 5.2))

$0.5 \mu\text{M}$  ausgegangen. Unter diesen Bedingungen sind, abhängig vom Membranpotential, ca. 90% der Transporter im Zustand  $[E_0]$ . Dies zeigt, dass bei den Simulationen des vorstationären Stromsignals nicht davon ausgegangen werden kann, dass alle Transporter sich im Zustand  $[E_0]$  befinden wie es bei reinen *zero-trans*-Bedingungen der Fall sein sollte. Dies ist insbesondere für die folgende Analyse des  $\text{Ba}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschs von Bedeutung, bei dem die vorstationären Stromsignale eine Umkehr der Spannungsabhängigkeit der Ladungsverschiebung bei einer Erhöhung der freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration vor der Photolyse gezeigt hatten.

Die Spannungsabhängigkeit der Zustandsverteilung zeigt, dass bei positiven Membranpotentialen mehr Transporter in Richtung intrazelluläre Seite verschoben werden, indem die Rückrate  $k_{32}$  beschleunigt (bzw. die Hinrate  $k_{23}$  verlangsamt) wird. Diese Spannungsabhängigkeit erklärt auch die beobachtete Abnahme der Ladungsverschiebung bei positiven Membranpotentialen: Es befinden sich zwar mehr Transporter auf der intrazellulären Seite im Zustand  $[E_0]$  und sind somit zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung bereit, aber insgesamt erfolgt

nach einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung eine geringere Zustandsverschiebung über den elektrogenen Schritt  $\text{E}_2 \rightleftharpoons \text{E}_3$  hinweg zur extrazellulären Seite. Dadurch ist die Ladungsverschiebung bei positiven Potentialen entsprechend kleiner als bei negativen Membranpotentialen. Eine solche Spannungsabhängigkeit stimmt mit den bei  $\text{Ca}^{2+}$ -Flux-Messungen im  $\text{Ca}^{2+}\text{-Ca}^{2+}$ -Austausch gefundenen Resultaten überein, nach denen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstrom bei positiven Membranpotentialen reduziert wird (DiPolo und Beaugé, 1987).

### Folgerungen aus dem $\text{Ba}^{2+}\text{-Ca}^{2+}$ -Austausch

Die Messungen zum  $\text{Ba}^{2+}\text{-Ca}^{2+}$ -Austausch haben als wichtigstes Ergebnis gezeigt, dass bei Wahl geeigneter Messbedingungen (hier: der Einsatz von  $\text{Ba}^{2+}$  statt  $\text{Ca}^{2+}$  auf der extrazellulären Seite) eine zusätzliche, langsame Phase im Abklingen des vorstationären Stromsignals nach einem intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung zu beobachten ist. Dies ist mit dem im vorangegangenen Abschnitt vorgeschlagenen 5-Zustandsmodell und den Parametern des Fits Nr. 2 nicht ohne weiteres zu erklären. Eine zusätzliche langsame Phase deutet auf einen zusätzlichen langsamen Reaktionsschritt hin, der in diesem Fall dem elektrogenen Schritt nachfolgen muss. Im 5-Zustandsmodell ist der dem elektrogenen Schritt nachfolgende Schritt der  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungs-/Dissoziationsschritt. Denkbar wäre daher, dass die  $\text{Ba}^{2+}$ -Bindung im Vergleich zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung wesentlich langsamer erfolgt. Da zudem eine Erniedrigung der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von

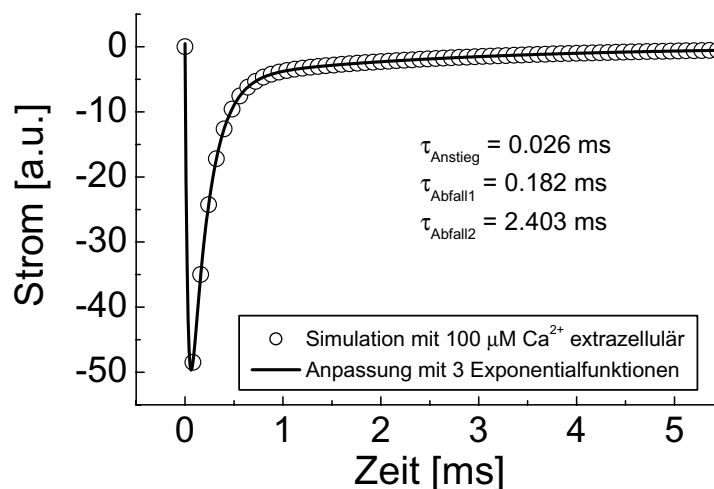


Abbildung 5.8: Simulation eines intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprungs bei niedriger extrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration

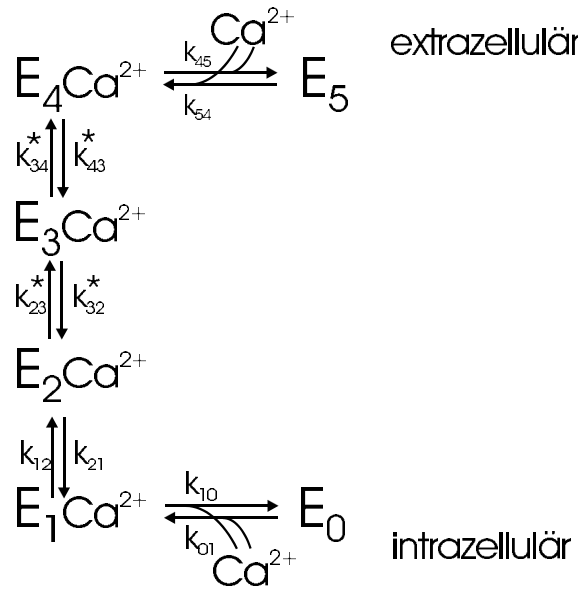
Simulationsparameter siehe Fit 6, Tabelle 5.2. Abweichend von den Parametern in Tabelle 5.2 wurde von einer extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von  $100 \mu\text{M}$  ausgegangen. Es zeigt sich eine zusätzliche langsame Phase im Abklingen des simulierten Stromsignal nach einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung auf  $100 \mu\text{M}$ . Die verschobene Ladung beträgt  $-23.9 \text{ fC}$  bei einem Spitzenstrom von  $-50 \text{ pA}$ .

Fitparameter:  $\tau_{\text{Anstieg}} = 0.026 \text{ ms}$ ,  $A_{\text{Anstieg}} = 78.8 \text{ [a.u.]}$ , Signalanteil 8% ;  $\tau_{\text{Abfall1}} = 0.182 \text{ ms}$ ,  $A_{\text{Abfall1}} = -73.1 \text{ [a.u.]}$ , Signalanteil 47% ;  $\tau_{\text{Abfall2}} = 2.41 \text{ ms}$ ,  $A_{\text{Abfall2}} = -5.3 \text{ [a.u.]}$ , Signalanteil 45% .

$5 \text{ mM}$  auf  $500$  bzw.  $100 \mu\text{M}$  im Photolyseexperiment im  $\text{Ca}^{2+}\text{-Ca}^{2+}$ -Austausch ebenfalls eine zusätzliche langsame Phase im Abklingen des vorstationären Signals ergeben hat,

müsste die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsrate  $k_{43}$  auf der extrazellulären Seite allerdings in der Größenordnung  $10^6 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$  statt  $10^9 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$  liegen. Diese Möglichkeit wurde im vorangehenden Abschnitt als Fit Nr. 6 in Tabelle 5.2 in Betracht gezogen. Mit den gefundenen Fitparametern ließen sich die Resultate des  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschs bei einer extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 5 mM durchaus zufriedenstellend simulieren. Eine qualitative Simulation eines intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationssprungs mit den Parametern des Fits Nr. 6 in Tabelle 5.2 bei einer extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von  $100 \mu\text{M}$  statt 5 mM ist in Abbildung 5.8 dargestellt. Wie in der Abbildung zu sehen ist, ergibt sich tatsächlich eine zusätzliche langsame Phase im Abklingen des transienten Stromsignals. Sowohl die Zeitkonstante des Signalanstiegs  $\tau_{\text{Anstieg}}$  als auch die Zeitkonstante der schnellen Phase des Signalabklingens  $\tau_{\text{Abfall1}}$  liegen in der selben Größenordnung wie beim  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationssprungexperiment mit 5 mM extrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, während die zusätzliche langsame Phase eine Zeitkonstante von ca. 2 ms aufweist. Die verschobene Ladung beträgt -47.8 fC (normiert auf einen Spitzenstrom von -100 pA). Vergleicht man diesen Wert mit den experimentellen Werten von ca. -50 fC (siehe Experimententeil auf Seite 97), so liegen diese recht gut überein. Die Ladungsverschiebung (d.h., dass Integral des simulierten Stromsignals) wäre damit deutlich größer als im  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch bei 5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  extrazellulär bzw. niedriger als im  $\text{Ba}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch ( $\approx -30$  bzw.  $\approx -65$  fC, experimentelle Werte aus t-Test Tabelle 4.3 auf Seite 95), wie es die experimentellen Daten erfordern. Der Anteil der langsamen Phase an der Ladungsverschiebung (das heißt, der Beitrag zum Integral des transienten Signals) beträgt ca. 45%. Im  $\text{Ba}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschexperiment hat die langsame Phase dagegen bis zu 75% (bei gleicher Größenordnung der Zeitkonstanten der langsamen Phase) an der Ladungsverschiebung ausgemacht. Dieser hohe Anteil an der Ladungsverschiebung würde eventuell auf eine Elektrogenizität des Bindungs-/Dissoziationsschritts auf der extrazellulären Seite hindeuten. Allerdings spricht generell gegen ein 5-Zustandsmodell mit einer extrazellulären Bindungsrate von  $2 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ , dass die Bindung diffusionskontrolliert und damit in der Größenordnung von  $10^9 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$  sein sollte (Läuger, 1987). Eine diffusionskontrollierte Bindung sollte dann auch bei einer extrazellulären  $\text{Ba}^{2+}$ -Konzentration von 5 mM vorliegen. Daher ist es wahrscheinlicher, dass der Bindung auf der extrazellulären Seite ein langsamer Reaktionsschritt nachfolgt. Dieser zusätzliche langsame Reaktionsschritt wäre somit vom Bindungs-/Dissoziationsschritt und dem schnellen elektrogenen Schritt eingeschlossen. Aus dem 5-Zustandsmodell ergibt sich ein 6-Zustandsmodell, wie es in Abbildung 5.9 dargestellt ist: Einer schnellen Bindung auf beiden Seiten der Membran folgen zwei okkludierte Zustände  $E_2$  und  $E_3$ . Der Übergang zwischen diesen okkludierten Zuständen muss sehr schnell und elektrogen sein, um mit den im vorangehenden Abschnitt diskutierten Folgerungen aus den Messungen zum  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch kompatibel zu sein. Ein 6-Zustandsmodell für den  $\text{Ca}^{2+}$ -Translokationszweig wurde bereits von Matsuoka und Hilgemann (1992) diskutiert. Matsuoka und Hilgemann gehen allerdings von einer Elektrogenizität der  $\text{Ca}^{2+}$ -Okklusion auf der intrazellulären Seite (im obigen Schema in Abb. 5.9 der Schritt  $E_1 \rightleftharpoons E_2$ ) aus. Dies widerspricht den im vorangehenden Abschnitt diskutierten Ergebnissen aus dem  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch, wonach dieser Schritt ratenlimitierend und nichtelektrogen sein muss.



Abbildung 5.9: Reaktionsschema des  $\text{Ca}^{2+}$ -Translokationszweiges mit 6 Zuständen

Das 5-Zustandsmodell wurde um einen zusätzlichen Reaktionsschritt  $E_3 \rightleftharpoons E_4$  zwischen schnellem elektrogenen Schritt  $E_2 \rightleftharpoons E_3$  und extrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung-/Dissoziation  $E_4 \rightleftharpoons E_5$  erweitert. Die elektrogenen Schritte sind mit einem \* gekennzeichnet.

Ein Nachteil des 6-Zustandsmodells ist, dass das zugrunde liegende System von gekoppelten Differentialgleichungen zu viele freie Parameter besitzt, um eine sinnvolle *least-square*-Anpassung an die gemessenen Daten nach einer numerischen Integration des Gleichungssystems durchzuführen. Daher soll nur eine qualitative Betrachtung erfolgen, ob die wichtigsten Eigenschaften der experimentellen Daten reproduziert werden können. Hierzu wurde das Differentialgleichungssystem des 5-Zustandssystems um eine zusätzliche Differentialgleichung erweitert und dieses System numerisch integriert. Die Parameter wurden, soweit möglich, an den Fit Nr. 2 (siehe Tabelle 5.2) des 5-Zustandssystems angelehnt und die zusätzlichen Parameter manuell variiert. Da davon ausgegangen wird, dass die  $\text{Ba}^{2+}$ -Bindung ebenso wie die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung diffusionskontrolliert mit einer Rate von mindestens  $2 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$  erfolgt, muss ein anderer Reaktionsschritt beim  $\text{Ba}^{2+}$ -Transport im Vergleich zum  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport durch z.B. eine andere sterische Konformation verlangsamt sein. Um die zusätzliche langsame Phase im  $\text{Ba}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch erklären zu können, wird daher die Rate  $k_{43}$  des Okklusionsschritts auf der extrazellulären Seite als deutlich verlangsamt im Vergleich zum  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch angenommen. Mit diesen Randbedingungen wurde dann sowohl ein intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung im  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch bei 5 mM und 100  $\mu\text{M}$  extrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration als auch im  $\text{Ba}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch mit 5 mM  $\text{Ba}^{2+}$  extrazellulär und variierender intrazellulärer freier  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration vor dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Sprung simuliert. Die Parameter der Simulationen mit dem 6-Zustandsmodell sind in der Tabelle 5.3 zusammengefasst.

Abbildung 5.10 zeigt eine Simulation eines  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprungs im  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch bei 0.1 bzw. 5 mM extrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration: Bei niedriger extrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration fällt das vorstationäre Signal biexponentiell ab, während

Parameter	$\text{Ca}^{2+}\text{-Ca}^{2+}$ -Austausch	$\text{Ba}^{2+}\text{-Ca}^{2+}$ -Austausch	Anmerkung
$k_{01}$ $[M^{-1}s^{-1}]$	$2 \cdot 10^9$	$2 \cdot 10^9$	
$k_{10}$ $[s^{-1}]$	200000	200000	gemäß $K_D^{intr.} = 100 \mu\text{M}$
$k_{12}$ $[s^{-1}]$	10000	10000	
$k_{21}$ $[s^{-1}]$	1000	1000	
$k_{23}$ $[s^{-1}]$	20000	20000	$\alpha = 0.16$
$k_{32}$ $[s^{-1}]$	25000	25000	
$k_{34}$ $[s^{-1}]$	1000	1000	$\alpha = 0.08$
$k_{43}$ $[s^{-1}]$	10000	100	
$k_{45}$ $[s^{-1}]$	6000000	6000000	gemäß $K_D^{extr.} = 3 \text{ mM}$
$k_{54}$ $[M^{-1}s^{-1}]$	$2 \cdot 10^9$	$2 \cdot 10^9$	

Tabelle 5.3: Simulationsparametern für das 6-Zustandsmodell

bei hoher extrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nur ein monoexponentieller, spannungsunabhängiger Signalabfall zu verzeichnen ist. Das heißt, bei hoher extrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ist das Stromsignal nach einem simulierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationssprung im 6-Zustandsmodell nicht von dem mit dem 5-Zustandsmodell simulierten zu unterscheiden. Um dieses Verhalten zu erreichen, muss der extrazelluläre Okklusionsschritt, analog zum intrazellulären Okklusionsschritt, asymmetrische Raten aufweisen. Zudem muss der  $K_D^{extr.}$ -Wert für  $\text{Ca}^{2+}$  auf der extrazellulären Seite  $>1 \text{ mM}$  sein. Dies ist durchaus mit Literaturwerten vereinbar, da für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung auf der extrazellulären Seite apparente  $K_{0.5}$ -Werte von 0.1 bis 1.4 mM angegeben werden (Blaustein und Lederer, 1999). Damit lassen sich mit dem 6-Zustandsmodell und den Parametern in Tabelle 5.3 die unter  $\text{Ca}^{2+}\text{-Ca}^{2+}$ -Austauschbedingungen experimentell gefundenen Resultate qualitativ reproduzieren.

Eine Simulation unter  $\text{Ba}^{2+}\text{-Ca}^{2+}$ -Austauschbedingungen zeigen die Abbildungen 5.11 (Zustandsverteilungen) und 5.12 (simuliertes vorstationäres Stromsignal), bei der die Rate  $k_{43}$  des Okklusionsschritts auf der extrazellulären Seite als verlangsamt im Vergleich zum  $\text{Ca}^{2+}\text{-Ca}^{2+}$ -Austausch angenommen wird (siehe Tabelle 5.3). Die Simulation wurde für zwei unterschiedliche intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen (0.1 bzw. 1  $\mu\text{M}$ ) vor einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationssprung auf 100  $\mu\text{M}$  durchgeführt. In beiden Fällen ergibt sich ein biexponentiell abfallendes Signal. Allerdings zeigt das Signal bei hoher intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration vor dem Konzentrationssprung eine deutliche Umkehr der Spannungsabhängigkeit des Spitzenstroms und der verschobenen Ladung (Anstieg bei depolarisierenden Membranpotentialen statt Abnahme wie im  $\text{Ca}^{2+}\text{-Ca}^{2+}$ -Austausch). Ein solches Verhalten wurde auch unter experimentellen Bedingungen beobachtet und lässt sich somit qualitativ in den Simulationen reproduzieren. Die zugehörigen Zustandsverteilungen in Abbildung 5.11 erklären dieses Phänomen: Bei hyperpolarisierendem Membranpotential befinden sich bei hoher intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ein Großteil der Transporter bereits in den Zuständen  $E_4$  und  $E_5$ . Bei depolarisierenden Potentialen erfolgt eine deutliche Verschiebung der Transporter zur intrazellulären Seite, so dass mehr

Transporter zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung bereit sind und nach einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung über die elektrogenen Schritte verschoben werden können.

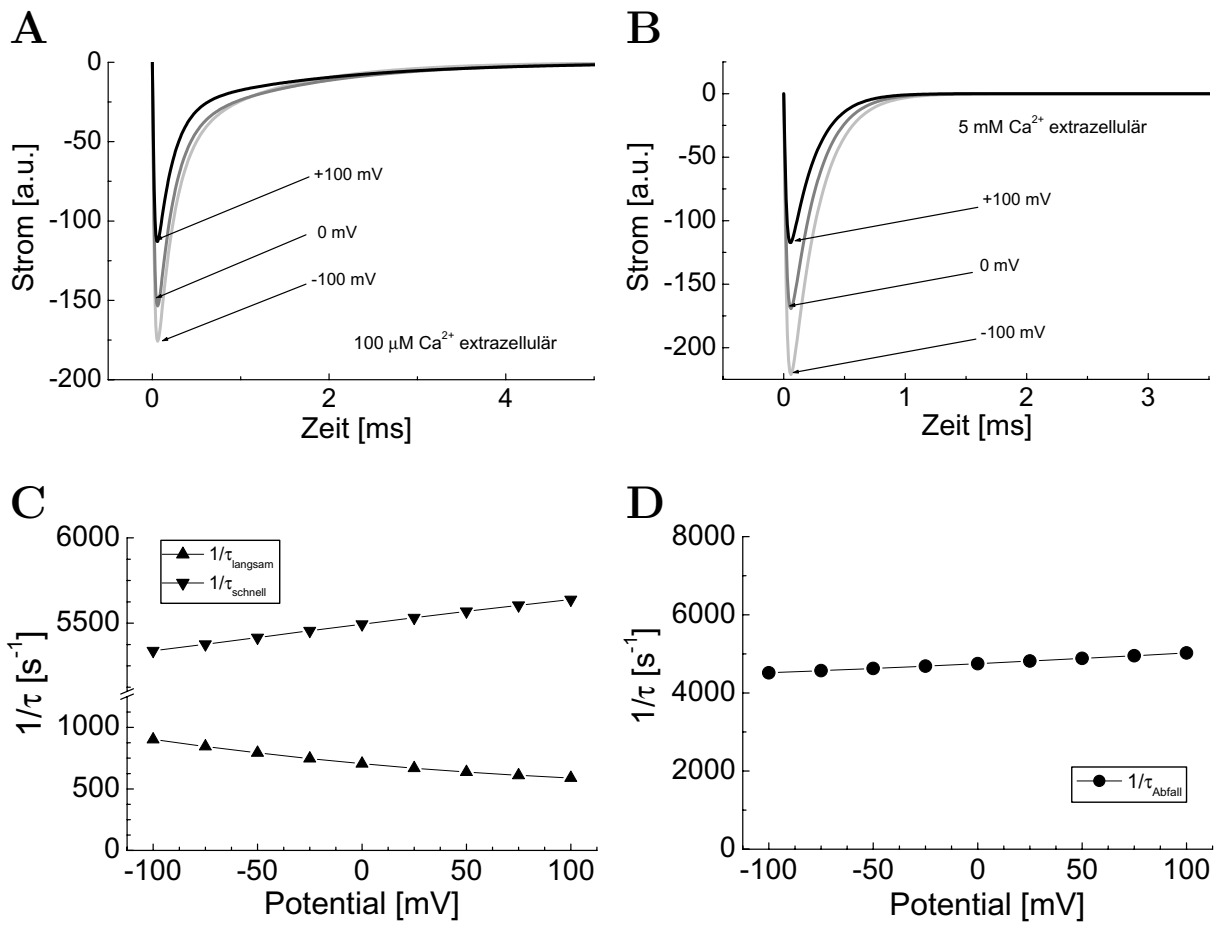


Abbildung 5.10: Simulation des  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschs mit dem 6-Zustandsmodell bei 100  $\mu\text{M}$  und 5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  extrazellulär

Simuliert wurde ein intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung auf 100  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  (intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration vor dem Sprung 0.5  $\mu\text{M}$ ). Bei 100  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  extrazellulär ergibt sich ein biphasischer Signalabfall. Die Ladungverschiebung bei 0 mV, normiert auf -100 pA Spitzenstrom, beträgt -59.7 fC (A). Die zugehörigen Geschwindigkeitskonstanten für den Signalabfall zeigen eine leichte Spannungsabhängigkeit (C). Bei 5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  extrazellulär ergibt sich ein monoexponentieller Signalabfall. Die Ladungverschiebung bei 0 mV, normiert auf -100 pA Spitzenstrom, beträgt -27.9 fC (B). Die zugehörige Geschwindigkeitskonstante ist praktisch spannungsunabhängig (D).

Die experimentellen Daten hatten gezeigt, dass die langsame Phase des Signalabfalls mit bis zu 75% zur Ladungverschiebung beiträgt. Um dies in den Simulationen zu erreichen, musste der extrazelluläre Okklusionsschritt spannungsabhängig gesetzt werden. Dies wäre im Gegensatz zu der von Matsuoka und Hilgemann (1992) diskutierten Elektrogenizität des Okklusionsschritts auf der intrazellulären Seite (und der Nichtelettrogenizität des Okklusionsschritts auf der extrazellulären Seite). Ob dies tatsächlich der Fall ist, könnten photolytische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprünge auf der extrazellulären Seite zeigen. Diese würden eventuell auch eine Bestimmung weiterer kinetischer Parameter erlauben, mit denen dann eine genauere quantitative Analyse eines 6-Zustandsmodells für

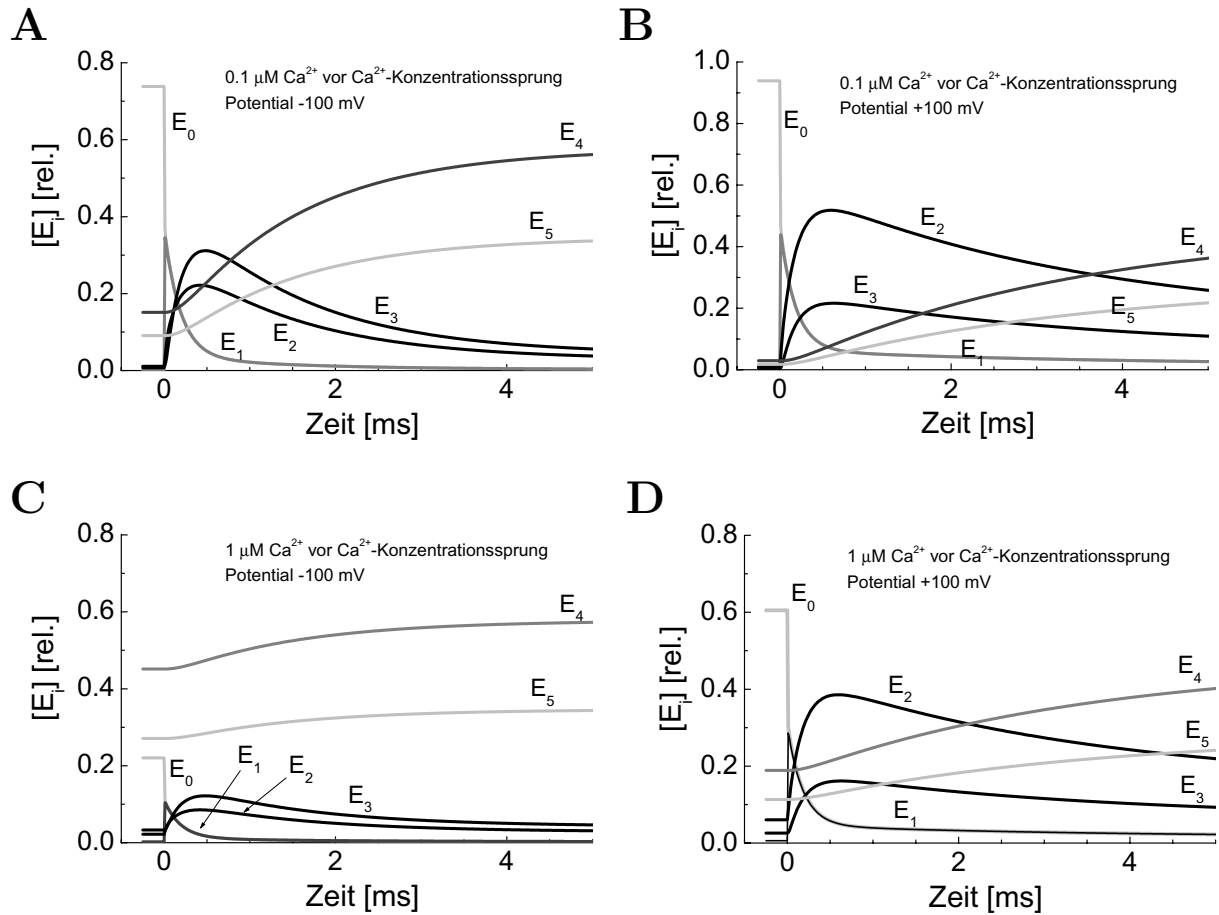


Abbildung 5.11: Zustandsverteilung im 6-Zustandsmodell des  $\text{Ba}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschs. Die Zustandsverteilung wurde für zwei verschiedene Membranpotentiale ( $-100$  und  $+100$  mV) bei  $0.1 \mu\text{M Ca}^{2+}$  intrazellulär (A und B) und bei  $1 \mu\text{M Ca}^{2+}$  intrazellulär (C und D) vor einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung (Zeitpunkt  $t=0$  ms) auf  $100 \mu\text{M}$  simuliert (siehe hierzu auch Abb. 5.12).

den  $\text{Ca}^{2+}$ -Translokationszweig möglich wäre.

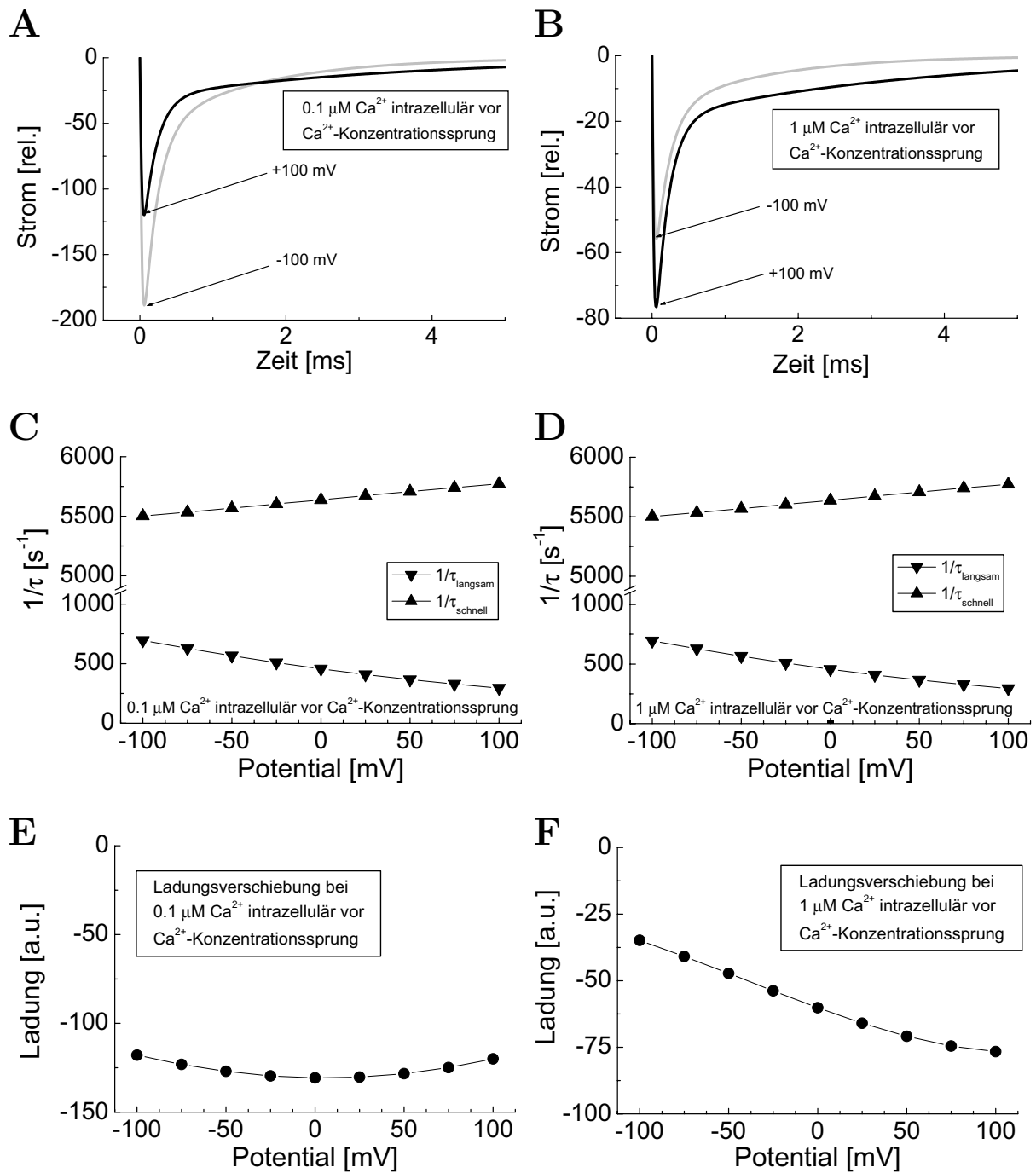


Abbildung 5.12: Simulation des vorstationären Stromsignals im  $\text{Ba}^{2+}\text{-Ca}^{2+}$ -Austausch mit dem 6-Zustandsmodell

Zur Simulation wurde von einer intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von  $0.1 \mu\text{M}$  (A, C, E) bzw.  $1 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  vor einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung auf  $100 \mu\text{M}$  bei Membranpotentialen zwischen  $-100$  und  $+100 \text{ mV}$  ausgegangen. Deutlich zu erkennen ist die Umkehr der Spannungsabhängigkeit des Spitzenstroms bei der höheren intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration vor dem Konzentrationsprung (A vs. B), während die Geschwindigkeitskonstanten des Signalabfalls unbeeinflusst sind (C vs. D). Die höhere intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führt letztlich zu einer Zunahme der verschobenen Ladung bei depolarisierenden Membranpotentialen (F).

## Simulation der Spannungssprungexperimente

Da die von Hilgemann (1996) gezeigten Spannungssprungexperimente nicht eindeutig im Experiment reproduziert werden konnten, sollten sie dennoch sowohl mit dem 5-Zustandsmodell als auch mit 6-Zustandsmodell für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Translokation simuliert werden. Hierzu wurden die Parameter gemäß Fit Nr. 2, Tabelle 5.2 bzw. Tabelle 5.3 gewählt. Dabei wurde von einer intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von  $2 \mu\text{M}$  und von einer extrazellulären Konzentration von  $1 \text{ mM}$  ausgegangen, den Versuchsbedingungen Hilgemanns. Die Simulation eines Spannungssprungexperiments ist in Abbildung 5.13 zu sehen. Sowohl mit dem 5-Zustands- als auch mit dem 6-Zustandsmodell ergibt sich ein sehr schnell abklingendes transientes Stromsignal (A und B). Eine Anpassung des Signalabfalls mit 2 bzw. 3 Exponentialfunktionen liefert die aus dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationssprungexperiment bekannten Zeitkonstanten (bzw. die korrespondierenden Geschwindigkeitskonstanten, siehe E und F). Allerdings ist auch eine Anpassung mit nur einer bzw. zwei Exponentialfunktionen sehr gut, da die Amplituden der langsameren Phasen deutlich unter 5% der schnellen Phase (entspricht dem Signalanstieg im Konzentrationssprungexperiment) liegen. Im realen Experiment wären sie daher mit großer Wahrscheinlichkeit nicht zu sehen, da sie im Signalrauschen untergehen würden. Dies erklärt möglicherweise auch die schwierige Reproduzierbarkeit der Daten Hilgemanns, da er direkt die Ladungsverschiebung mit Hilfe eines umgebauten Verstärkers gemessen hat: Im integrierten Stromsignal (siehe C bzw. D) ist die langsame Phase deutlich besser zu erkennen. Ein direkter Vergleich mit den von Hilgemann publizierten Abbildungen spricht eher für das 6-Zustandsmodell, da hier die langsame Phase ausgeprägter ist. Allerdings ist die schnelle Phase immer noch zu stark vertreten und die Geschwindigkeitskonstanten der langsamen Phasen (siehe E bzw. F) mit beiden Modellen zeigen eine zu schwach ausgeprägte Spannungsabhängigkeit im Vergleich zu Hilgemann (1996). Dies bestätigt auch die Ladungsverschiebung (siehe G bzw. H): Eine Anpassung mit einer Boltzmann-Funktion

$$Q = Q_{\min} + (Q_{\max} - Q_{\min}) / \left( 1 + e^{((U-U_0) \cdot \frac{\alpha z F}{RT})} \right)$$

liefert nur ein  $\alpha$  von 0.13 bzw. 0.15 im Vergleich zu 0.24 gemäß Hilgemann (1996). Auch hier könnte eine genauere Untersuchung des  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschs durch Konzentrationssprungexperimente auf der extrazellulären Seite weitere Aufschlüsse liefern, da möglicherweise die Spannungsabhängigkeit des postulierten Okklusionsschrittes auf der extrazellulären Seite von Bedeutung ist.

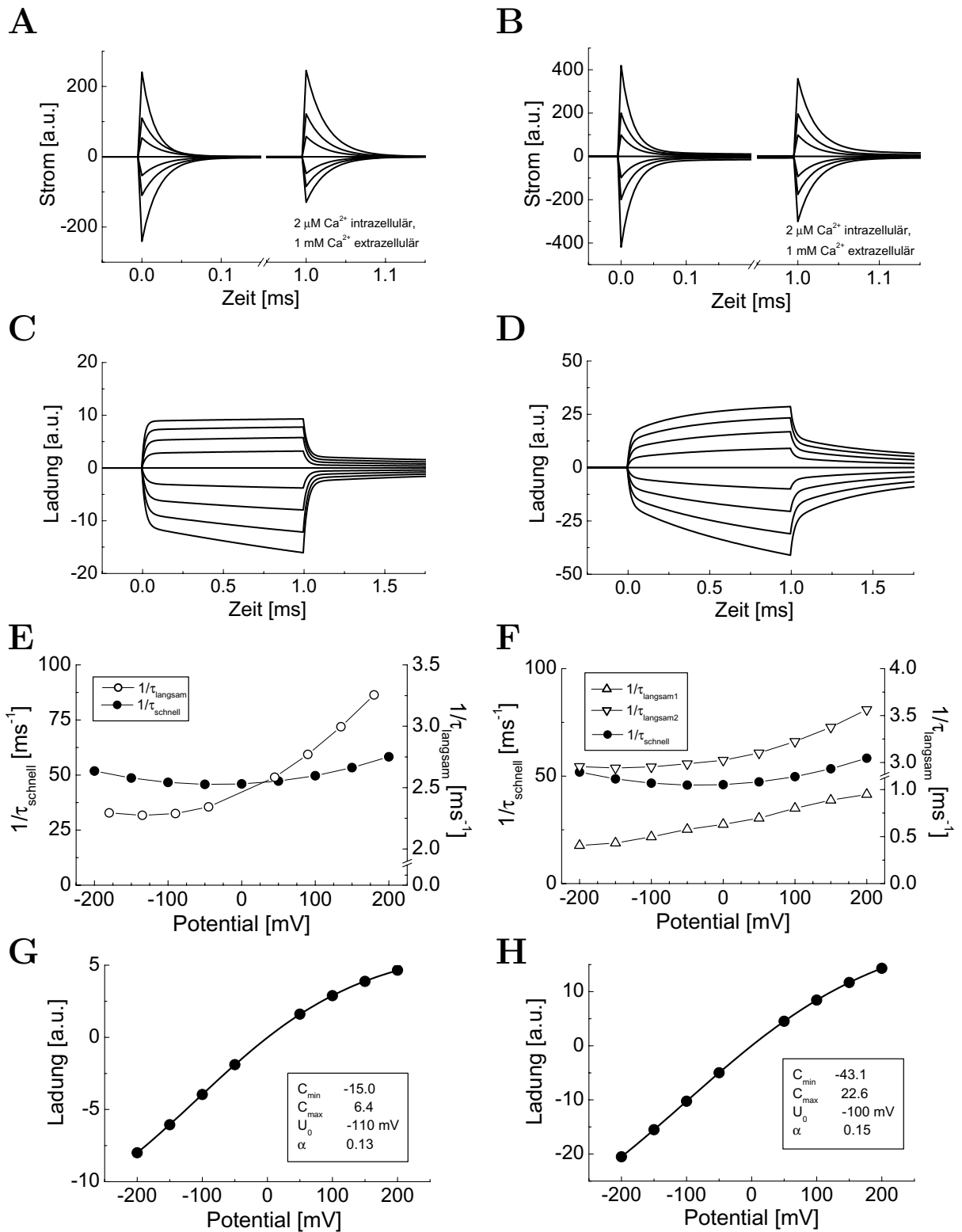


Abbildung 5.13: Simulation der Spannungssprungexperimente im  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch. Zur Simulation wurde sowohl das 5-Zustandsmodell (A, C, E, G) als auch das 6-Zustandsmodell (B, D, F, H) herangezogen. Als Parameter wurden 2  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  intrazellulär und 1 mM extrazellulär gewählt, um einen Vergleich mit den Ergebnissen von Hilgemann (1996) zu ermöglichen. Weiteres siehe Text.

### Simulation des $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschs

Zur Simulation des  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschs wurde das in Abbildung 5.14 dargestellte konsequente Reaktionsschema mit 5 bzw. 6 Zuständen für den  $\text{Ca}^{2+}$ -Translokationszweig zu Grunde gelegt. Fasst man die 3  $\text{Na}^+$ -Bindungs- und Dissoziationszustände zur Vereinfachung in je einen Zustand zusammen, so ergibt sich ein 7- bzw. 8-Zustandsmodell. Durch die im Experiment gewählten *zero-trans*-Bedingungen können die jeweiligen Rückraten vernachlässigt werden, so dass sich ein zyklisches Reaktionsschema ohne Rückraten ergibt. Dies erleichtert die Analyse des Schemas, nach dem wieder ein System gekoppelter

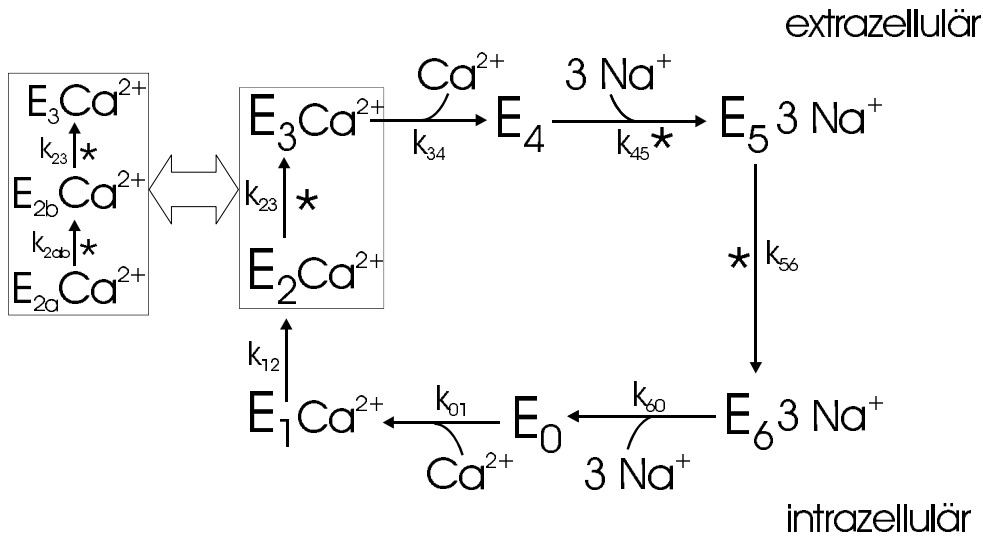


Abbildung 5.14: Reaktionsschema des  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Reaktionszyklus

Es wird alternativ von fünf bzw. sechs Zuständen für den  $\text{Ca}^{2+}$ -Translokationszweig ausgegangen (siehe Umrandung). Die drei  $\text{Na}^+$ -Bindungs- und Dissoziationschritte sind im Schema aus Übersichtlichkeitsgründen zu je einem Schritt zusammengefasst worden, sodass sich ein 7-Zustands- bzw. 8-Zustandsmodell für den vollen Zyklus ergibt. Die angenommenen elektrogenen Schritte sind mit einem \* gekennzeichnet.

Differentialgleichungen aufgestellt wurde (siehe unten), das dann numerisch integriert und die Simulationsparameter, so weit möglich, mittels eines *least-square*-Fit-Algorithmus an experimentelle Daten angepasst wurden. Für den  $\text{Ca}^{2+}$ -Translokationszweig wurden die Raten gemäß der Analyse in den vorangehenden Abschnitten vorgegeben. Zudem wurde vereinfacht davon ausgegangen, dass die drei  $\text{Na}^+$ -Bindungsstellen gleichwertig sind, so dass von identischen Bindungs- bzw. Dissoziationsraten für die  $\text{Na}^+$ -Ionen ausgegangen werden kann. Die Annahme nur eines einzelnen Translokationsschrittes zwischen  $\text{Na}^+$ -Bindung auf der extrazellulären Seite und Dissoziation auf der intrazellulären Seite stellt ebenfalls eine vereinfachende Mindestanforderung an den Reaktionszyklus dar. Da der  $\text{Na}^+$ -Translokationszweig elektrogene Schritte enthalten muss (Niggli und Lederer, 1991a, Hilgemann et al., 1991, Hilgemann und Ball, 1996), wurde bei den Simulationen von einer Elektrogenizität der extrazellulären  $\text{Na}^+$ -Bindung und der  $\text{Na}^+$ -Translokation ausgegangen. Eine Elektrogenizität der extrazellulären  $\text{Na}^+$ -Bindung wird von Matsuoka und Hilgemann (1992) favorisiert. Hierfür sprechen auch Kapazitätsmessungen im  $\text{Na}^+$ - $\text{Na}^+$ -Austauschmodus (Hilgemann, 1996).



$$\begin{aligned}
\frac{d}{dt}[E_0] &= -k_{01} \cdot [Ca^{2+}]_{intr.} \cdot [E_0] + k_{60} \cdot [E_{6c}] \\
\frac{d}{dt}[E_1] &= -k_{12} \cdot [E_1] + k_{01} \cdot [Ca^{2+}]_{intr.} \cdot [E_0] \\
\frac{d}{dt}[E_2] &= -k_{23}^0 \cdot e^{-\left(\frac{U_{e0}\alpha_{23}}{2kT}\right)} \cdot [E_2] + k_{12} \cdot [E_1] \\
\frac{d}{dt}[E_3] &= -k_{34} \cdot [E_3] + k_{23}^0 \cdot e^{-\left(\frac{U_{e0}\alpha_{23}}{2kT}\right)} \cdot [E_2] \\
\frac{d}{dt}[E_4] &= -3 \cdot k_{45}^0 \cdot e^{-\left(\frac{U_{e0}\alpha_{45}}{2kT}\right)} \cdot [Na^+]_{extr.} \cdot [E_4] + k_{34} \cdot [E_3] \\
\frac{d}{dt}[E_{5a}] &= -2 \cdot k_{45}^0 \cdot e^{-\left(\frac{U_{e0}\alpha_{45}}{2kT}\right)} \cdot [Na^+]_{extr.} \cdot [E_{5a}] + 3 \cdot k_{45}^0 \cdot e^{-\left(\frac{U_{e0}\alpha_{45}}{2kT}\right)} \cdot [Na^+]_{extr.} \cdot [E_4] \\
\frac{d}{dt}[E_{5b}] &= -k_{45}^0 \cdot e^{-\left(\frac{U_{e0}\alpha_{45}}{2kT}\right)} \cdot [Na^+]_{extr.} \cdot [E_{5b}] + 2 \cdot k_{45}^0 \cdot e^{-\left(\frac{U_{e0}\alpha_{45}}{2kT}\right)} \cdot [Na^+]_{extr.} \cdot [E_{5a}] \\
\frac{d}{dt}[E_{5c}] &= -k_{56}^0 \cdot e^{-\left(\frac{U_{e0}\alpha_{56}}{2kT}\right)} \cdot [E_{5c}] + k_{45}^0 \cdot e^{-\left(\frac{U_{e0}\alpha_{45}}{2kT}\right)} \cdot [Na^+]_{extr.} \cdot [E_{5b}] \\
\frac{d}{dt}[E_{6a}] &= -3 \cdot k_{60} \cdot [E_{6a}] + k_{56}^0 \cdot e^{-\left(\frac{U_{e0}\alpha_{56}}{2kT}\right)} \cdot [E_{5c}] \\
\frac{d}{dt}[E_{6b}] &= -2 \cdot k_{60} \cdot [E_{6b}] + 3 \cdot k_{60} \cdot [E_{6a}] \\
\frac{d}{dt}[E_{6c}] &= -k_{60} \cdot [E_{6c}] + 2 \cdot k_{60} \cdot [E_{6b}]
\end{aligned}$$

Tabelle 5.4: Differentialgleichungssystem des Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-Transportzyklus mit 5 Zuständen für die Ca<sup>2+</sup>-Translokation und identischen Na<sup>+</sup>-Bindungs- und Dissoziationsschritten. Für das 6-Zustandsmodell des Ca<sup>2+</sup>-Translokationszweiges muss das Differentialgleichungssystem entsprechend erweitert werden.

Zusammen mit einem (5-Zustandsmodell für die Ca<sup>2+</sup>-Translokation) bzw. zwei (6-Zustandsmodell) elektrogenen Schritten bei der Ca<sup>2+</sup>-Translokation muss der volle Zyklus des Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-Austauschs mindestens zwei bis vier elektrogene Schritte aufweisen. Da bei einer Stöchiometrie von 1 Ca<sup>2+</sup> : 3 Na<sup>+</sup> insgesamt eine Nettoladung verschoben wird, muss die Randbedingung

$$\sum_{i \neq j} \alpha_{ij} = 1 \quad (5.11)$$

erfüllt sein.  $\alpha_{ij}$  stellt wieder den Dielektrizitätskoeffizienten des elektrogenen Teilschrittes  $E_i \rightarrow E_j$  dar. Das Stromsignal ergibt sich entsprechend als Summation der in den einzelnen Teilschritten verschobenen Ladungen:

$$I = \sum_{i \neq j} \alpha_{ij} \cdot e_0 \cdot k_{ij} \cdot [E_i] \quad (5.12)$$

Trotz der Vorgabe der Parameter für den Ca<sup>2+</sup>-Translokationszweig, und den oben genannten Vereinfachungen ist das Differentialgleichungssystem immer noch überparametrisiert.

trisiert, sodass sich bei einem Multivariationsfit mit einer Anpassung an gemessene Stromsignale bei drei verschiedenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen und Membranpotentialen zunächst keine sinnvollen Resultate ergaben. Daher wurden weitere Parameter manuell vorgegeben, um so die Anzahl der freien Parameter zu verringern. Die so ermittelten Parameter dienten dann als Startwerte für weitere Anpassungen, da die Vorgabe geeigneter Startwerte einen entscheidenden Einfluss auf die Konvergenz des Fit-Algorithmus und damit die Qualität der *least-square*-Anpassung hatte. Als wichtiges Kriterium für die Qualität des Fits galt die Wiedergabe des Verhältnis von Spitzenstrom zu stationärem Strom. Dieses Verhältnis wurde durch die experimentellen Stromsignale bei verschiedenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprüngen, an die die *least-square*-Anpassung erfolgte, vorgegeben. Zudem sollten die apparenten  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinitäten des stationären Stroms, des Spitzenstroms und der Geschwindigkeitskonstanten möglichst gut reproduziert werden. Hierzu wurden die gewonnenen Fitparameter zur Simulation von Stromsignalen bei verschiedenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen herangezogen und aus diesen die apparenten  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinitäten des stationären Stroms, des Spitzenstroms und der Geschwindigkeitskonstanten des Signalabfalls des Stromtransienten nachträglich ermittelt.

Die Kombination von *least-square*-Anpassung des simulierten Stromsignals zur Bestimmung der freien Parameter und manueller Vorgabe eines Teils der Parameter hat einige wichtige Punkte ergeben, ohne die eine qualitative Simulation des  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschs sowohl mit dem 7-Zustandsmodell als auch mit dem 8-Zustandsmodell nur unbefriedigende Resultate lieferte:

- Ein Festsetzen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsrate auf  $2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  ergab in den Simulationen auch bei niedrigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprüngen ein transientes Stromsignal und widersprach damit den experimentellen Daten. Wurde die Bindungsrate nicht festgehalten, ergab der *least-square*-Fit einen Wert von  $\approx 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  und entspricht damit der aus den experimentellen Daten zum  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch bestimmten Größenordnung. Hier gilt es die im Vergleich zur Bindungsrate deutlich langsamere  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungsrate bei der DM-Nitrophen-Photolyse von mindestens  $38000 \text{ s}^{-1}$  (Ellis-Davies et al., 1996) zu berücksichtigen, die ratenlimitierend für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung wirkt. Eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsrate  $< 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  hatte auf der anderen Seite einen zu langsamen Anstieg des simulierten vorstationären Stromsignals zur Folge.
- Die  $\text{Na}^+$ -Bindung muss ebenfalls mindestens  $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  betragen, wie eine *least-square*-Anpassung ergeben hat. Dies ist durchaus sinnvoll, da auch die  $\text{Na}^+$ -Bindung diffusionskontrolliert sein sollte. Ein manuelles Festsetzen auf eine deutlich niedrigere Rate ergab nur unzulängliche Simulationsresultate. Die  $\text{Na}^+$ -Bindungsrate wurde daher auf  $2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  festgesetzt.
- Eine stark geschwindigkeitsbestimmende  $\text{Na}^+$ -Translokationsrate  $\ll 1000 \text{ s}^{-1}$  führte zu einem deutlichen multiexponentiellen Signalabfall. Eine Rate in der Größenordnung  $\geq 10000 \text{ s}^{-1}$  hatte dagegen ein zu schwach ausgeprägtes transientes Signal bei hohen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprüngen zur Folge. Bei freier Variation des Parameters (statt fester Vorgabe) hat der *least-square*-Fit erwartungsgemäß eine Größenordnung von  $2000 \text{ s}^{-1}$  für die  $\text{Na}^+$ -Translokation ergeben.

- Die Elektrogenizität des Na<sup>+</sup>-Translokationszweiges darf nicht alleine im Na<sup>+</sup>-Translokationsschritt liegen, da bei den gegebenen Parametern die Simulationen sonst zum Teil Oszillationen im Signal gezeigt haben bzw. der stationäre Strom eine zu starke Spannungsabhängigkeit im Vergleich zum Spitzenstrom aufgewiesen hat. Hier zeigte sich insbesondere die Problematik der Überparametrisierung. Eine geeignetere Vorgabe einiger Parameter könnte durchaus bessere Ergebnisse zur Folge gehabt haben.
- Eine Rate in der Größenordnung von 100 s<sup>-1</sup> als feste Vorgabe für den zusätzlichen okkludierten Zustand im 6-Zustandsmodell des Ca<sup>2+</sup>-Translokationszweigs hatte auch bei der Simulation niedriger Ca<sup>2+</sup>-Konzentrations sprünge ein transientes Signal zur Folge. Zudem zeigte der stationäre Strom keine Ca<sup>2+</sup>-Abhängigkeit mehr, sodass von einer Rate von  $\geq 1000$  s<sup>-1</sup> ausgegangen werden kann. Dies stimmt mit dem qualitativ abgeschätzten Wert von 1000 s<sup>-1</sup> für die Rate  $k_{34}$  des 6-Zustandsmodell des Ca<sup>2+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-Austauschs überein (siehe Tabelle 5.3).

Eine Übersicht über die Simulationsparameter bei unterschiedlicher Verteilung der Spannungsabhängigkeit auf den Ca<sup>2+</sup>-Translokationszweig bzw. den Na<sup>+</sup>-Translokationszweig ist in Tabelle 5.5 zusammengefasst. Neben den Simulationsparametern sind auch die sich aus diesen ergebenden Werte für die apparenten Ca<sup>2+</sup>-Affinitäten des Spitzenstroms, des stationären Stroms und der Geschwindigkeitskonstanten  $1/\tau$  sowie die Dielektrizitätskoeffizienten als Maß für die Spannungsabhängigkeit des Spitzenstroms und des stationären Stroms aufgeführt. Diese wurden über eine Auswertung eines mit den jeweiligen Parametern erstellten Satzes simulierter Stromsignale bei Ca<sup>2+</sup>-Konzentrations sprünge auf 5 bzw. 150  $\mu$ M und Membranpotentialen zwischen -100 und +100 mV ermittelt. Abbildung 5.15A bis F zeigt ein solches simuliertes Stromsignal bei verschiedenen Ca<sup>2+</sup>-Konzentrations sprünge und Membranpotentialen mit den zugehörigen Auswertungen. Als Parameter wurden die Werte aus Tabelle 5.5, Simulation Nr. 6 genommen. Insgesamt spiegeln die Simulationen nicht vollständig die experimentellen Daten wieder. Dies betrifft insbesondere die Spannungsabhängigkeit des Signalabfalls des transienten Stromsignals: Alle Simulationen zeigen hier eine leichte Spannungsabhängigkeit, die in den eigenen experimentellen Daten nicht gesehen wurde. Da diese Spannungsabhängigkeit in erster Linie auf die Elektrogenizität der Na<sup>+</sup>-Translokation zurückzuführen ist, deutet dies eventuell auf weitere nicht-elektrogene, ratenlimierende Schritte im Na<sup>+</sup>-Translokationszweig hin. Allerdings bleibt anzumerken, dass bei Messungen am nativen Austauscher in Cardiomyozytenmembranen eine Spannungsabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten gesehen wurde (Kappl et al., 2001), die jedoch bei den Messungen am heterolog in Oozyten exprimierten Austauscher nicht reproduziert werden konnte.

Die apparenten Ca<sup>2+</sup>-Affinitäten des stationären Stroms, des Spitzenstroms und der Geschwindigkeitskonstanten des Signalabfalls werden nur von den Simulationen 4 und 6 zufriedenstellend widerspiegelt: Während der  $K_M^{Ca^{2+}}$ -Wert des stationären Stroms in allen Simulationen bei ca. 7  $\mu$ M liegt und damit den experimentellen Daten ( $5.6 \pm 0.4$   $\mu$ M) entspricht, zeigen nur die Simulationen 4 und 6 annähernd die richtige Größenordnung der  $K_M$ -Werte des Spitzenstroms (19.4 bzw. 17.6  $\mu$ M) und der Geschwindigkeitskonstanten

Parameter	Sim 1	Sim 2	Sim 3	Sim 4	Sim 5	Sim 6	Anmerkung
Ca <sup>2+</sup> -Bindung	$1.56 \cdot 10^8$	$1.56 \cdot 10^8$	$1.15 \cdot 10^9$	$1.15 \cdot 10^8$	$1.15 \cdot 10^8$	$1.15 \cdot 10^8$	$5 \cdot 10^8 M^{-1} s^{-1}$ 1)
Okklusion (intr.)	$[s^{-1}]$	10000	10000	10000	10000	10000	Parameter fest 2)
Ca <sup>2+</sup> -Translokation	$[s^{-1}]$	16000	16000	16000	16000	16000	Parameter fest 2)
Okklusion (extr.)	$[s^{-1}]$	—	1604	1604	1604	1604	$1000 s^{-1}$ 3)
Ca <sup>2+</sup> -Dissoziation	$[s^{-1}]$	60000	60000	60000	60000	60000	Parameter fest 2), 3)
Na <sup>+</sup> -Bindung	$[M^{-1} s^{-1}]$	$2 \cdot 10^9$	$2 \cdot 10^9$	$2 \cdot 10^9$	$2 \cdot 10^9$	$2 \cdot 10^9$	Parameter fest
Na <sup>+</sup> -Translokation	$[s^{-1}]$	1530	1530	2192	2192	2192	
Na <sup>+</sup> -Dissoziation	$[s^{-1}]$	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^6$	Parameter fest
$\alpha_{Ca^{2+}-Translokation}$		0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	Parameter fest 1), 2)
$\alpha_{Ca^{2+}-Okklusion}$		—	—	0.08	0.08	0.22	Parameter fest
$\alpha_{Na^{+}-Bindung\ extr.}$		0.1267	0.06	0.1	0.1567	0.1	Parameter fest
$\alpha_{Na^{+}-Translokation}$		0.4	0.4	0.1	0.11	0.28	Parameter fest
$[Na^{+}]_{extr.}$	$[mM]$	100	100	100	100	100	Parameter fest
$[Ca^{2+}]_{intr.}$	$[\mu M]$	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	$[Ca^{2+}]_{intr.}$ vor Photolyse
$K_{M,stat}^{Ca^{2+}}$	$[\mu M]$	7.3	7.3	6.6	6.9	6.5	$5.6 \pm 0.4 \mu M$ 1)
$K_{M,Spitze}^{Ca^{2+}}$	$[\mu M]$	29.1	22.1	21.4	19.4	17.6	$30.9 \pm 3.0 \mu M$ 1)
$K_{M,1/\tau}^{Ca^{2+}}$	$[\mu M]$	21.3	29.8	34.1	76.9	53.4	$98.5 \pm 21.3 \mu M$ 1)
Spannungsabhängigkeit $\tau_{Abfall}$	ja	ja	ja	ja	ja	ja	
$\alpha_{stat,Strom}$ (bei 5/150 $\mu M$ Ca <sup>2+</sup> )	0.11/0.32	0.20/0.44	0.10/0.23	0.20/0.41	0.19/0.42	0.25/0.52	$0.35 \pm 0.05 / 0.41 \pm 0.05$ (bei 6.3/164 $\mu M$ Ca <sup>2+</sup> ) 1)
$\alpha_{Spitzenstrom}$ (bei 5/150 $\mu M$ Ca <sup>2+</sup> )	0.10/0.11	0.19/0.20	0.10/0.14	0.19/0.18	0.17/0.26	0.23/0.28	$0.34 / 0.34 \pm 0.03$ (bei 19.9/164 $\mu M$ Ca <sup>2+</sup> ) 1)
Turnover-Rate	$[s^{-1}]$	1133	1133	751	751	751	bei 100 $\mu M$ Ca <sup>2+</sup> intr. und 0 mV, $T = 23^\circ C$

1) aus exp. Daten, 2) aus Sim. Ca<sup>2+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-Austausch, 3) aus Sim. Ba<sup>2+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-Austausch

Tabelle 5.5: Simulationsparameter des Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-Austauschs

Simulationen 1 und 2: 7-Zustandsmodell (Ca<sup>2+</sup>-Translokation mit 5 Zuständen), Simulationen 3 bis 6: 8-Zustandsmodell (Ca<sup>2+</sup>-Translokation mit 6 Zuständen)

Anmerkung: Die Werte für die Na<sup>+</sup>-Bindung und zugehörigem Dielektrizitätskoeffizienten  $\alpha$  sowie für die Na<sup>+</sup>-Dissoziation gelten für ein einzelnes Na<sup>+</sup>-Ion. Da von identischen Na<sup>+</sup>-Bindungsstellen ausgegangen wird, werden sie im Text zu jeweils einem einzelnen Zustand zusammengefasst, sodass sich ein 7-Zustands- bzw. 8-Zustandsmodell ergibt.

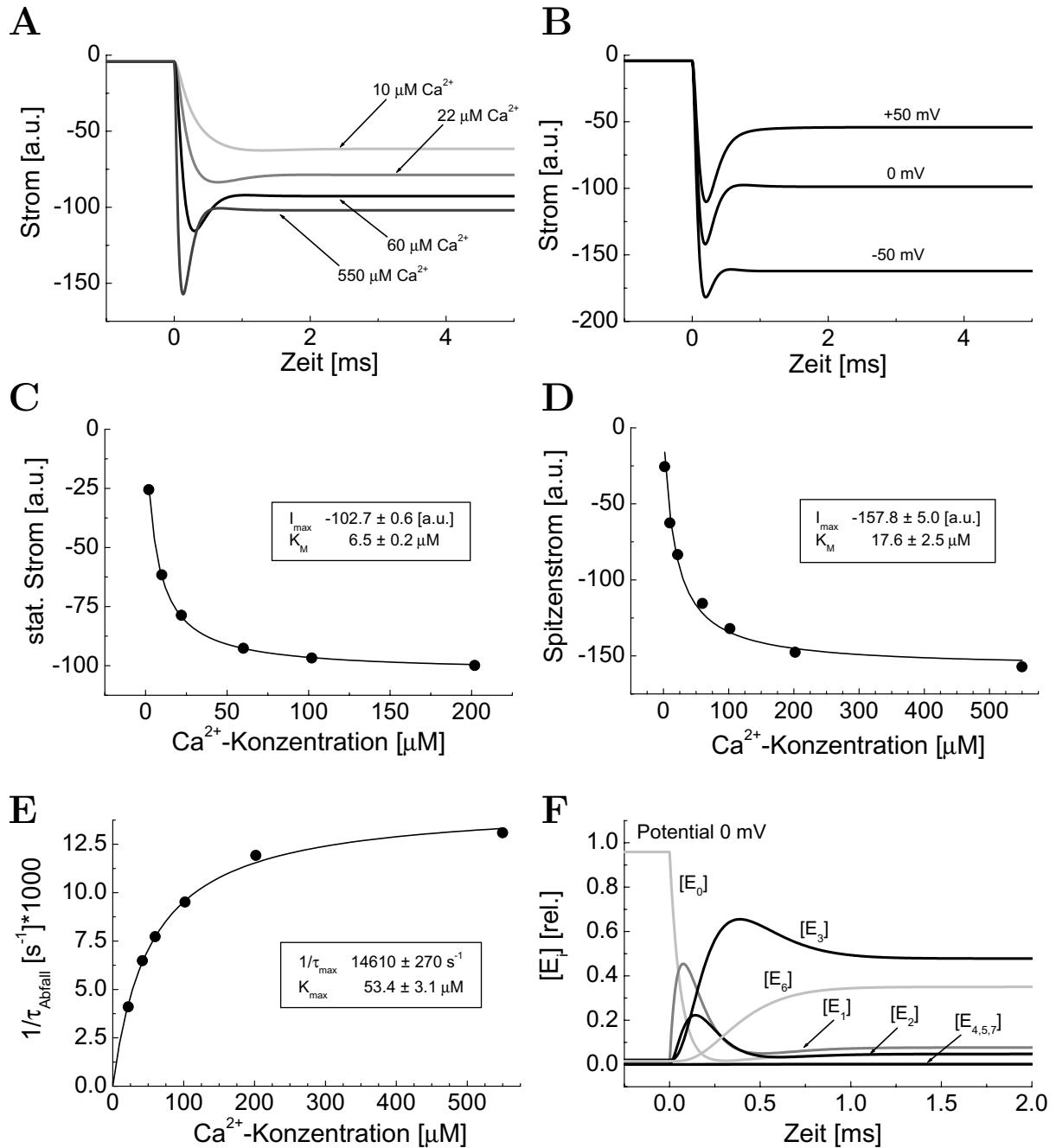


Abbildung 5.15: Simulation des vorstationären Stromsignals im  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch mit dem 8-Zustandsmodell

Zur Simulation wurde von einer intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 0.3  $\mu\text{M}$  vor dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung ausgegangen.

*A* Simuliertes vorstationäres Stromsignal bei verschiedenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprüngen.

*B* Simulierte Spannungsabhängigkeit des vorstationären Stromsignals bei einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung auf 150  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ . Das Verhältnis von Spitzenstrom zu stationärem Strom wird im Vergleich zu den experimentellen Daten nur unbefriedigend reproduziert.

*C bis E* Simulierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit des stationären Stroms, Spitzenstroms und der Geschwindigkeitskonstanten  $1/\tau_{\text{Abfall}}$  bei einem Membranpotential von 0 mV.

*F* Zustandsverteilung bei einem simulierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung auf 100  $\mu\text{M}$  (Zeitpunkt  $t=0$ ) bei einem Membranpotential von 0 mV. Die je drei  $\text{Na}^+$ -Bindungs- und Dissoziationszustände wurden in jeweils einem Zustand  $[E_6]$  bzw.  $[E_7]$  zusammengefasst.

(76.9 bzw. 53.4  $\mu\text{M}$ ). Diese Werte liegen aber immer noch ca. 30% unter den experimentell ermittelten Werten von  $30.9 \pm 3.0$  bzw.  $98.5 \pm 21.3 \mu\text{M Ca}^{2+}$  für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität des Spitzenstroms bzw. der Geschwindigkeitskonstanten des Signalabfalls. Durch diese Abweichung wird das in den experimentellen Daten gesehene Verhältnis von Spitzenstrom zu stationärem Strom daher nicht ganz korrekt wiedergegeben. Gleiches gilt für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten  $1/\tau$  des Signalabfalls.

Die Spannungsabhängigkeit des stationären Stroms wird mit Ausnahme von Simulation 1 und 3 von allen Simulationen annehmbar wiedergegeben, während die Spannungsabhängigkeit des Spitzenstroms zu schwach ausgeprägt ist. Dies zeigen die zugehörigen Dielektrizitätskoeffizienten  $\alpha_{\text{stat.Strom}}$  (0.41-0.52 bei 150  $\mu\text{M Ca}^{2+}$  in den Simulationen,  $0.41 \pm 0.05$  bei  $\approx 164 \mu\text{M Ca}^{2+}$  in experimentellen Daten) bzw.  $\alpha_{\text{Spitzenstrom}}$  (0.18-0.28 bei 150  $\mu\text{M Ca}^{2+}$  in den Simulationen,  $0.34 \pm 0.03$  bei  $\approx 164 \mu\text{M Ca}^{2+}$  in experimentellen Daten). Dadurch ergibt sich abhängig vom Membranpotential eine Verschiebung des Verhältnisses von Spitzenstrom zum stationären Strom (vgl. Abb. 5.15B), die zu einer inadäquaten Wiedergabe der Spannungsabhängigkeit der experimentellen Daten führt.

Bei den Abweichungen der Simulationen von den experimentellen Daten bleibt zu berücksichtigen, dass es sich nur um qualitative Simulationen handelt. Für eine genaue quantitative Analyse hat das Differentialgleichungssystem zuviele Parameter, um eine exaktere Aussage über die Größenordnung der Raten treffen zu können. Zudem würden mehr  $\text{Na}^{+}$ -Translokationsschritte als der eine angenommene einzelne Schritt die Situation möglicherweise grundsätzlich ändern. Insofern reproduzieren die Simulationen 4 und 5 durchaus noch zufriedenstellend die experimentell gewonnenen Daten.

Eine Simulation des vorstationären Stromsignals nach einem intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung im  $\text{Na}^{+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschmodus wurde bereits von Kappl (1997) vorgenommen. Aufgrund der zu dem Zeitpunkt inkompletten Daten zur  $\text{Ca}^{2+}$ - und Spannungsabhängigkeit des vorstationären Stroms im  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschmodus hat Kappl allerdings nur ein 4-Zustandsmodell für den  $\text{Ca}^{2+}$ -Translokationszweig zugrunde gelegt. Ein solches 4-Zustandsmodell ist mit jetzt vorliegenden Daten nicht mehr plausibel. Ein Vergleich der ermittelten Parametern ist aber dennoch interessant: So hat Kappl für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung eine Rate von  $1.3 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$  ermittelt, ein Wert der gut mit dem hier bestimmten Wert übereinstimmt. Die elektrogene  $\text{Ca}^{2+}$ -Translokation hat Kappl zu ca.  $1300 \text{ s}^{-1}$  bestimmt, ein Wert der deutlich vom hier vorgeschlagenen Wert von mindestens  $16000 \text{ s}^{-1}$  abweicht. Allerdings hat Kappl mit dem 4-Zustandsmodell auch keine okkludierenden Zustände berücksichtigt. Nimmt man die für den extrazellulären Okklusionschritt vorgeschlagene Rate von  $1600 \text{ s}^{-1}$ , die ratenlimitierend wirkt, so erklärt diese möglicherweise die deutliche Abweichung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Translokationsraten. Kappl geht zudem von einem der  $\text{Ca}^{2+}$ -Translokation nachfolgenden geschwindigkeitsbestimmenden Schritt ( $\text{Na}^{+}$ -Bindung bzw. -Translokation) von nur maximal  $150 \text{ s}^{-1}$  aus. Eine solche niedrige Rate ist mit den hier durchgeführten Simulationen nicht kompatibel, da ein Festsetzen der  $\text{Na}^{+}$ -Translokationsrate auf Werte  $\ll 1000 \text{ s}^{-1}$  keine zufriedenstellenden Simulationsergebnisse ergab.

Zusätzlich ist in der Tabelle 5.5 in der letzten Spalte die Turnover-Rate bei 0 mM  $\text{Na}^{+}$  und 100  $\mu\text{M Ca}^{2+}$  intrazellulär aufgeführt, die sich aus den in den Simulationen ermittelten

Parametern über die Gleichung

$$k_{Turnover} = \left( \sum_{i \neq j} k_{ij}^{-1} \right)^{-1}$$

ergibt. Sie liegt bei der Simulation mit dem 7-Zustandsmodell bei ca. 1100 s<sup>-1</sup> und bei der Simulation mit dem 8-Zustandsmodell bei ca. 750 s<sup>-1</sup>, insgesamt also in der Größenordnung von 1000 s<sup>-1</sup> (bei Raumtemperatur). Dieser Wert stimmt mit Literaturwerten von einigen 1000 s<sup>-1</sup> (bei physiologischer Temperatur) recht gut überein (Hilgemann et al., 1991, Niggli und Lederer, 1991, Hilgemann, 1996, Kappl und Hartung, 1996b, Baazov et al., 1999). Die Turnover-Rate des Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-Austauschers liegt damit deutlich höher als z.B. bei der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase mit ca. 200 s<sup>-1</sup> (Friedrich et al., 1996).

### 5.2.6 Abschließende Bemerkungen

Bedingt durch die Komplexität der Kinetik des Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-Austauschers lassen sich die einzelnen Parameter der vorgeschlagenen Reaktionsschemas und die sich daraus ergebende Turnover-Rate im Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-Austausch nicht eindeutig bestimmen. Die Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationsprungexperimente mittels Photolyse von DM-Nitrophen haben aber sowohl im Ca<sup>2+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-Austausch (inklusive Ba<sup>2+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-Austausch) als auch im Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-Austausch neue Einsichten in die molekularen Prozesse geliefert. Dies betrifft insbesondere den Ca<sup>2+</sup>-Translokationszweig des Reaktionszyklusses: Die Ca<sup>2+</sup>-Bindung auf der intrazellulären Seite muss demnach nicht-elektrogen und schnell (wahrscheinlich diffusionskontrolliert) sein, gefolgt von einem ratenlimitierenden ( $\approx 10000$  s<sup>-1</sup>), ebenfalls nicht-elektrogenen Reaktionsschritt, der eine starke Asymmetrie bezüglich der Reaktionsraten aufweist. Der nachfolgende, elektrogene Ca<sup>2+</sup>-Translokationsschritt muss dagegen sehr schnell verlaufen ( $\approx 20000$  s<sup>-1</sup>). Zu einem ähnlichen Schluss sind Kappl et al. (2001) gekommen. Mit der hier vorliegenden vollständigen Ca<sup>2+</sup>-Abhängigkeit und Spannungsabhängigkeit des transienten Stromsignals im Ca<sup>2+</sup>-Ca<sup>2+</sup>- und Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-Austauschs konnten jedoch detailliertere Aussagen getroffen werden. Eine spannungsunabhängige Ca<sup>2+</sup>-Bindung ist zwar im Widerspruch zu vorgeschlagenen Modellen von Matsuoka und Hilgemann (1992), aber nur mit dieser Spannungsunabhängigkeit lässt sich das Sättigungsverhalten des Spitzenstroms und der Geschwindigkeitskonstanten bei hohen Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationsprüngen verstehen.

Die Ba<sup>2+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-Austauschexperimente deuten darauf hin, dass diesem schnellen, elektrogenen Schritt vermutlich ein weiterer, aber deutlich langsamerer Reaktionsschritt folgt. Nur so ist die zusätzliche Phase im Abklingen des transienten Stromsignals zu erklären, sofern man von einer schnellen Ca<sup>2+</sup>- bzw. Ba<sup>2+</sup>-Bindung auf der extrazellulären Seite ausgeht: Durch den Ba<sup>2+</sup>-Transport muss eine der schnellen, elektrogenen Ca<sup>2+</sup>-Translokation nachfolgende Reaktion geschwindigkeitsbestimmend werden. Dies könnte eine verlangsamte Konformationsänderung bei der extrazellulären Ba<sup>2+</sup>-Okklusion sein, die unter Ca<sup>2+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-Transportbedingungen schnell und damit bisher nicht sichtbar verläuft.

Eine schnelle, diffusionskontrollierte Ca<sup>2+</sup>-Bindung wurde von Läger (1987) vorgeschlagen, sodass ein Okklusionszustand sowohl auf der intrazellulären als auch auf der extrazellulären wahrscheinlich ist. Ein sich damit ergebendes 6-Zustandsmodell für den Ca<sup>2+</sup>-Translokationszweig ist übereinstimmend mit Modellen von Matsuoka und Hilgemann (1992). Allerdings gibt es auch hier wieder Widersprüche: Matsuoka und Hilgemann

gehen von einer spannungsabhängigen intrazellulären Okklusion und einer spannungsunabhängigen extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Okklusion aus, während die hier vorliegenden Daten eher für eine entgegengesetzte Elektrogenizität sprechen. Insbesondere die beim  $\text{Ba}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch im Vergleich zum  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch beobachtete große Ladungsverschiebung deutet auf eine elektrogene extrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Okklusion hin.

Der elektrogene  $\text{Na}^{+}$ -Translokationsschritt muss im Vergleich zum  $\text{Ca}^{2+}$ -Translokationsschritt dagegen deutlich langsamer verlaufen und in der Größenordnung  $\approx 2000 \text{ s}^{-1}$  liegen. Deutlich andere Werte ließen keine vernünftige Simulation zu, sofern das Reaktionsschema nicht weitere Reaktionsschritte aufweist, die aus Simplitzitätsgründen hier nicht berücksichtigt werden konnten. So gehen Omelchenko und Hryshko (1996) neben extra- und intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Okklusionszuständen auch von entsprechenden  $\text{Na}^{+}$ -Okklusionszuständen aus. Neben einer elektrogenen  $\text{Na}^{+}$ -Translokation (Niggli und Lederer, 1991, Hilgemann et al., 1991, Matsuoka und Hilgemann, 1992) wurde auch von einer elektrogenen, extrazellulären  $\text{Na}^{+}$ -Bindung ausgegangen, auf die insbesondere Kapazitätsmessungen im  $\text{Na}^{+}$ - $\text{Na}^{+}$ -Austauschmodus hindeuten (Hilgemann, 1996).

Damit ergibt sich eine Turnover-Rate für den einwärtsgerichteten  $\text{Na}^{+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch von  $\approx 1000 \text{ s}^{-1}$  (bei Raumtemperatur), die mit über andere Messmethoden bestimmten Werten in der Literatur übereinstimmt (Hilgemann et al., 1991, Niggli und Lederer, 1991, Hilgemann, 1996, Kappl und Hartung, 1996b, Baazov et al., 1999).

Insgesamt lässt sich festhalten, dass die heterologe Expression des  $\text{Na}^{+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers in *Xenopus* Oozyten in Kombination mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprüngen durch Photolyse von DM-Nitrophen eine gute Möglichkeit darstellt, um detaillierte kinetische Daten zu bekommen. Insbesondere das bessere Signal-Rausch-Verhältnis gegenüber Patch-Clamp-Messungen an Cardio-Myocyten-Membranen stellt einen großen Vorteil dar. Bei den Messungen konnten die aus den Messungen am nativen Protein bekannten Details weitestgehend reproduziert bzw. vertieft werden. Dies betrifft insbesondere das vorstationäre Stromsignal im  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Na}^{+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch, dass das gleiche Verhalten gezeigt hat wie bei Messungen am nativen Protein (Powell et al., 1993, Kappl und Hartung, 1996a,b). Ungeklärt ist dagegen die Abweichung bezüglich der Spannungsabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten des Signalabfalls im  $\text{Na}^{+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschmodus: Die von Kappl et al. (2001) beobachtete Spannungsabhängigkeit konnte nicht reproduziert werden. Gleiches gilt für die Spannungssprungexperimente  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschmodus (Hilgemann, 1996, He, 1998), die auf eine Spannungsabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten auch im  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch hindeuten, aber nicht mit den Resultaten aus den Photolysemessungen übereinstimmen.

Um eine detailliertere Aussage über die Raten treffen zu können, würden sich  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprungexperimente auf der extrazellulären Seite anbieten. Diese könnten neue Hinweise zu den Reaktionsschritten auf der extrazellulären Seite liefern, und so eine gezieltere Analyse sowohl des  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschs als auch des  $\text{Na}^{+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschs erlauben. Hierfür würden sich Säugerzellen als Expressionssystem anbieten, da diese in der Ganzzellkonfiguration einen Zugang zur extrazellulären Seite erlauben und sich zudem als sehr stabil bei Laserpulsphotolyseexperimenten erwiesen haben (Grewer, 1999, Watzke, 2001).



# Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Kinetik von zwei  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Membranproteinen untersucht: zum einen des endogenen  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanals der *Xenopus*-Oozytenmembran, zum anderen des heterolog in Oozyten exprimierten  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers NCX1, kloniert aus dem Meerschweinchen-Herzen.

Der  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte Chloridkanal wird durch intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  im submikromolaren Konzentrationsbereich ( $K_D = 0.5 \mu\text{M } \text{Ca}^{2+}$ ) aktiviert und hat eine hohe Permeabilität für Chloridionen. In der ausgereiften Eizelle spielt er eine wichtige Rolle bei der Ausbildung des Fertilisationspotentials und verhindert durch eine Depolarisation der Membran eine Polyspermie.

Der  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher ist in der Herzmuskelzelle für die Ausbildung des Exzitations-Kontraktions-Zyklus von Bedeutung, indem er für die Aufrechterhaltung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Gradienten (freies  $\text{Ca}^{2+}$  intrazellulär  $\approx 100 \text{ nm}$ , extrazellulär  $\approx 2 \text{ mM}$ ) über die Plasmamembran verantwortlich ist. Unter physiologischen Bedingungen transportiert der  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion im Austausch gegen drei  $\text{Na}^+$ -Ionen aus der Zelle hinaus, und nutzt somit den  $\text{Na}^+$ -Gradienten neben dem Membranpotential als treibende Kraft.

Als Messmethode wurde die Patch-Clamp-Technik in der „*inside-out*-Makro-Patch-Konfiguration verwendet. Die Patch-Clamp-Technik erlaubt definierte ionale Bedingungen auf beiden Seiten der Membran. Cytoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrations sprünge wurden zum einen durch Lösungswechsel, insbesondere aber durch die Photolyse von DM-Nitrophen, einem photolabilen  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator, hervorgerufen. Die Photolyse von DM-Nitrophen erlaubte, im Vergleich zum Lösungswechsel, sehr schnelle  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrations sprünge ( $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungsrates mindestens  $38000 \text{ s}^{-1}$ ).

Die kinetischen Untersuchungen am  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanal haben neue, über bisherige aus dem Lösungswechselexperiment bekannte hinausgehende, Erkenntnisse ergeben: Nach einem schnellen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrations sprung geht dem Signalanstieg auf einen stationären Wert eine deutlich schnellere Verzögerungsphase („*lag-phase*“) voraus. Sowohl der Signalanstieg als auch die Verzögerungsphase zeigen eine starke  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit, sind aber nur sehr schwach spannungsabhängig. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Signalanstieg den spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungs-/Dissoziationsschritt von mindestens zwei  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen widerspiegelt, während das spannungsunabhängige Kanalöffnen/-Schließen durch die Verzögerungsphase repräsentiert wird. Bei Spannungssprungexperimenten mit hoher Zeitaufösung konnte eine schnelle Inaktivierung nach einer Depolarisation der Membran gesehen werden, die in Gegenwart von sättigenden intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen zu einer Einwärtsgleichrichtung der Strom-Spannungskennlinie des stationären Stroms führt. Mit diesen Erkenntnissen konnte ein Reaktionsmodell für den

$\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanal aufgestellt werden, mit dem sich die experimentellen Daten simulieren ließen.

Die heterologe Expression des  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers in Oozyten hat zu einem deutlich verbesserten Signal-Rausch-Verhältnis im Vergleich zu früheren Messungen am nativen Austauscher in Cardio-Myocyten-Membranen geführt. Mit Hilfe der Photolyse von DM-Nitrophen konnte erstmals eine vollständige  $\text{Ca}^{2+}$ - und Spannungsabhängigkeit des vorstationären Einwärtsstroms, hervorgerufen durch einen cytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung, durchgeführt werden. Sowohl im  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ - als auch im  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschmodus zeigt sich ein transientes Einwärtsstromsignal (Anstieg messtechnisch nicht auflösbar), das sehr schnell relaxiert. Im  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschmodus zeigt sich nur ein transientes Stromsignal (kein Nettoladungstransport im stationären Zustand), während im  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch sich ein stationärer Einwärtsstrom einstellt.

Das transiente Stromsignal hat eine deutliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit sowohl für den Spitzenstrom ( $K_M = 30.9 \pm 3.0 \mu\text{M}$  im  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch,  $K_M = 57 \pm 10 \mu\text{M}$  im  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch) als auch für die Geschwindigkeitskonstante  $1/\tau$  des Signalabfalls ( $K_M = 98.5 \pm 21.3 \mu\text{M}$  im  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch,  $K_M = 76 \pm 11 \mu\text{M}$  im  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch) gezeigt. Die Relaxation des Stromtransienten erfolgt sowohl im  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ - als auch im  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch mit einer maximalen Geschwindigkeitskonstanten von  $\approx 10000 \text{ s}^{-1}$  nach sättigenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprüngen. Der Signalabfall hat sich über den gesamten untersuchten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsbereich als spannungsunabhängig herausgestellt, während der Spitzenstrom bei positiven Membranpotentialen deutlich abnimmt. Dies führt zu einer Spannungsabhängigkeit der verschobenen Ladung (Integral des transienten Stromsignals) im  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch. Aus diesen Erkenntnissen konnte für den  $\text{Ca}^{2+}$ -Translokationszweig (im Rahmen eines konsekutiven Transportmodells) folgendes Reaktionsschema aufgestellt werden: Einem spannungsunabhängigen, sehr schnellen  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungs/-Dissoziationsschritt (diffusionskontrolliert) auf der intrazellulären Membranseite folgt ein ebenfalls spannungsunabhängiger, aber ratenlimitierender Schritt (intrazellulärer Okklusionsschritt, asymmetrische Raten:  $10000$  vs.  $1000 \text{ s}^{-1}$ ). Der nachfolgende  $\text{Ca}^{2+}$ -Translokationsschritt muss sehr hohe Hin- und Rückraten aufweisen ( $\approx 20000 \text{ s}^{-1}$ ). Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Dissoziation/-Bindung auf der extrazellulären wird als sehr schnell (diffusionskontrolliert) und spannungsunabhängig angenommen. Weitergehende Einblicke haben der  $\text{Sr}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ - und der  $\text{Ba}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch geliefert. Während der  $\text{Sr}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch nahezu das gleiche Verhalten wie der  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch gezeigt hat, konnte nach einem intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsprung im  $\text{Ba}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch erstmals eine zusätzliche langsame Phase im Abklingen des transienten Einwärtsstromsignals beobachtet werden. Das transiente Signal hat im Vergleich zum  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch eine signifikant höhere Ladungsverschiebung aufgewiesen. Dies deutet auf einen zusätzlichen elektrogenen Reaktionsschritt hin (extrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Okklusion). Weitere elektrogene Schritte müssen im  $\text{Na}^+$ -Translokationszweig ( $\text{Na}^+$ -Bindungs- und  $\text{Na}^+$ -Translokationsschritt) liegen. Mit den aus diesen Erkenntnissen aufgestellten Reaktionsschemata ließen sich die experimentellen Daten erfolgreich simulieren. Die Gesamttransportrate im  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch liegt demnach bei  $\approx 1000 \text{ s}^{-1}$  bei Raumtemperatur und stimmt damit mit Literaturwerten von mehreren  $1000 \text{ s}^{-1}$  bei physiologischer Temperatur überein.

# Literaturverzeichnis

- ADAMS, S. R. UND TSIEN, R. Y. (1993). Controlling cell chemistry with caged compounds. *Annual Review of Physiology*, 55:755–784.
- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. UND WATSON, J. (1997). *Molekularbiologie der Zelle*. VCH, Weinheim, 3. auflage 1995 Ausgabe.
- ARREOLA, J., MELVIN, J. E. UND BEGENISICH, T. (1995). Inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{Cl}^-$  channels from secretory epithelial cells by low internal pH. *J Membr Biol*, 147(1):95–104.
- ARREOLA, J., MELVIN, J. E. UND BEGENISICH, T. (1996). Activation of calcium-dependent chloride channels in rat parotid acinar cells. *J Gen Physiol*, 108(1):35–47.
- ATTALI, B., GUILLEMARE, E., LESAGE, F., HONORE, E., ROMEY, G., LAZDUNSKI, M. UND BARHANIN, J. (1993). The protein ISK is a dual activator of  $\text{K}^+$  and  $\text{Cl}^-$  channels. *Nature*, 365(6449):850–852.
- BAAZOV, D., WANG, X. UND KHANANSHVILI, D. (1999). Time-resolved monitoring of electrogenic  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchange in the isolated cardiac sarcolemma vesicles by using a rapid-response fluorescent probe. *Biochemistry*, 38:1435–1445.
- BADER, C. R., BERTRAND, D. UND SCHWARTZ, E. A. (1982). Voltage-activated and calcium-activated currents studied in solitary rod inner segments from the salamander retina. *Journal of Physiology*, 331:253–284.
- BAKER, P. F., BLAUSTEIN, M. P., HODGKIN, A. L. UND STEINHARDT, R. A. (1969). The influence of calcium on sodium efflux in squid axons. *J Physiol*, 200(2):431–458.
- BARISH, M. E. (1983). A transient calcium-dependent chloride current in the immature xenopus oocyte. *Journal of Physiology*, 342:309–325.
- BARRY, P. H. UND LYNCH, J. W. (1991). Liquid junction potentials and small cell effects in patch-clamp analysis [published erratum appears in j membr biol 1992 feb;125(3):286]. *Journal of Membrane Biology*, 121(2):101–117.
- BARTSCHAT, D. K. UND LINDENMAYER, G. E. (1980). Calcium movements promoted by vesicles in a highly enriched sarcolemma preparation from canine ventricle. Calcium-calcium countertransport. *Journal of Biological Chemistry*, 255(20):9626–9634.

- BAUD, C., KADO, R. T. UND MARCHER, K. (1982). Sodium channels induced by depolarization of the xenopus laevis oocyte. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(10):3188–3192.
- BERRIDGE, M. J. (1995). Capacitive calcium entry. *Biochemical Journal*, 312:1–11.
- BERS, D. M., PATTON, C. UND NUCCITELLI, R. (1994). A practical guide to the preparation of  $\text{Ca}^{2+}$  buffers. *Methods in Cell biology*, 40:3–29.
- BLAUSTEIN, M. P. UND LEDERER, W. J. (1999). Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiological Reviews*, 79(3):763–854.
- BLAUSTEIN, M. P. UND RUSSELL, J. M. (1975). Sodium-calcium exchange and calcium-calcium exchange in internally dialyzed squid giant axons. *Journal of Membrane Biology*, 22(3-4):285–312.
- BLAUSTEIN, M. P. UND SANTIAGO, E. M. (1977). Effects of internal and external cations and of ATP on sodium-calcium and calcium-calcium exchange in squid axons. *Biophys J*, 20(1):79–111.
- BOORER, K. J., FORDE, B. G., LEIGH, R. A. UND MILLER, A. J. (1992). Functional expression of a plant plasma membrane transporter in xenopus oocytes. *FEBS Letters*, 302(2):166–168.
- BOTON, R., DASCAL, N., GILLO, B. UND LASS, Y. (1989). Two calcium-activated chloride conductances in xenopus laevis oocytes permeabilized with the ionophore A23187. *Journal of Physiology*, 408:511–534.
- BOTON, R., SINGER, D. UND DASCAL, N. (1990). Inactivation of calcium-activated chloride conductance in xenopus oocytes: roles of calcium and protein kinase C. *Pflügers Arch*, 416(1-2):1–6.
- BRACKMANN, U. (1986). *Lambdachrome Laser Dyes*. Lambda Physik, Göttingen.
- CALLAMARAS, N. UND PARKER, I. (2000).  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent activation of  $\text{Cl}^-$  currents in xenopus oocytes is modulated by voltage. *Am J Physiol Cell Physiol*, 278(4):C667–675.
- CAMPBELL, A. K. (1983). *Intracellular Calcium: its universal role as regulator*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester.
- CANNELL, M. B. UND NICHOLS, C. G. (1991). Effects of pipette geometry on the time course of solution change in patch clamp experiments. *Biophysical Journal*, 60(5):1156–1163.
- CENTINAIO, E., BOSSI, E. UND PERES, A. (1997). Properties of the  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{Cl}^-$  current of xenopus oocytes. *Cell Mol Life Sci*, 53(7):604–610.
- CERVETTO, L., LAGNADO, L., PERRY, R. J., ROBINSON, D. W. UND MCNAUGHTON, P. A. (1989). Extrusion of calcium from rod outer segments is driven by both sodium and potassium gradients. *Nature*, 337(6209):740–743.

- CHAN, H. C., KAETZEL, M. A., GOTTER, A. L., DEDMAN, J. R. UND NELSON, D. J. (1994). Annexin IV inhibits calmodulin-dependent protein kinase II-activated chloride conductance. A novel mechanism for ion channel regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 269(51):32464–32468.
- CHAN, H. C., WU, W. L., SO, S. C., CHUNG, Y. W., TSANG, L. L., WANG, X. F., YAN, Y. C., LUK, S. C., SIU, S. S., TSUI, S. K., FUNG, K. P., LEE, C. Y. UND WAYE, M. M. (2000). Modulation of the  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{Cl}^-$  channel by 14-3-3epsilon. *Biochem Biophys Res Commun*, 270(2):581–587.
- CHEN, T.-Y. UND MILLER, C. (1996). Nonequilibrium gating and voltage dependence of the  $\text{ClC-0 Cl}^-$  channel. *Journal of General Physiology*, 108:237–250.
- CLAPHAM, D. E. (1995). Calcium signaling. *Cell*, 80(2):259–268.
- CLIFF, W. H. UND FRIZZELL, R. A. (1990). Separate  $\text{Cl}^-$  conductances activated by cAMP and  $\text{Ca}^{2+}$  in  $\text{Cl}^-$ -secreting epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(13):4956–4960.
- COLLINS, A., SOMLYO, A. V. UND HILGEMANN, D. W. (1992). The giant cardiac membrane patch method: stimulation of outward  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchange current by MgATP. *Journal of Physiology*, 454:27–57.
- COLMAN, A. (1984). Translation of eukaryotic messenger RNA in xenopus oocytes. In Hames, B. D. und Higgins, S. J., Herausgeber, *Transcription and translation, a practical approach*. IRL Press, Oxford.
- CONDRESCU, M., CHERNAYA, G., KALARIA, V. UND REEVES, J. P. (1997). Barium influx mediated by the cardiac sodium-calcium exchanger in transfected chinese hamster ovary cells. *J Gen Physiol*, 109(1):41–51.
- COOPER, C. B., WINKFEIN, R. J., SZERENCSEI, R. T. UND SCHNETKAMP, P. P. (1999). cDNA cloning and functional expression of the dolphin retinal rod Na-Ca+K exchanger NCKX1: comparison with the functionally silent bovine NCKX1. *Biochemistry*, 38(19):6276–6283.
- COREY, D. UND STEVENS, C. (1983). Science and technology of patch recording electrodes. In Sakmann, B. und Neher, E., Herausgeber, *Single-Channel Recording*, Seiten 53–68. Plenum Press, New York, 1. Ausgabe.
- CRESPO, L. M., GRANTHAM, C. J. UND CANNELL, M. B. (1990). Kinetics, stoichiometry and role of the Na-Ca exchange mechanism in isolated cardiac myocytes. *Nature*, 345(6276):618–621.
- CUI, J., COX, D. H. UND ALDRICH, R. W. (1997). Intrinsic voltage dependence and  $\text{Ca}^{2+}$  regulation of mslo large conductance Ca-activated  $\text{K}^+$  channels. *J Gen Physiol*, 109(5):647–673.

- CUNNINGHAM, S. A., AWAYDA, M. S., BUBIEN, J. K., ISMAILOV, I., ARRATE, M. P., BERDIEV, B. K., BENOS, D. J. UND FULLER, C. M. (1995). Cloning of an epithelial chloride channel from bovine trachea. *J Biol Chem*, 270(52):31016–31026.
- CURRIE, K. P., WOOTTON, J. F. UND SCOTT, R. H. (1995). Activation of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{Cl}^-$  currents in cultured rat sensory neurones by flash photolysis of DM-nitrophen. *J Physiol*, 482(Pt 2):291–307.
- DASCAL, N., CHILCOTT, G. UND LESTER, H. A. (1992). Intracellular perfusion of xenopus oocytes. *Methods in Enzymology*, 207:345–352.
- DE CASTRO, F., GEJO-BARRIENTOS, E. UND GALLEG0, R. (1997). Calcium-activated chloride current in normal mouse sympathetic ganglion cells. *Journal of Physiology*, 498(Pt 2):397–408.
- DIP0LO, R. (1974). Effect of ATP on the calcium efflux in dialyzed squid giant axons. *J Gen Physiol*, 64(4):503–517.
- DIP0LO, R. (1979). Calcium influx in internally dialyzed squid giant axons. *J Gen Physiol*, 73(1):91–113.
- DIP0LO, R. UND BEAUGE, L. (1987). Characterization of the reverse Na/Ca exchange in squid axons and its modulation by  $\text{Ca}_i$  and ATP.  $\text{Ca}_i$ -dependent  $\text{Na}_i/\text{Ca}_o$  and  $\text{Na}_i/\text{Na}_o$  exchange modes. *Journal of General Physiology*, 90(4):505–525.
- DIP0LO, R. UND BEAUGE, L. (1991). Regulation of Na-Ca exchange: An overview. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 639:100–111.
- DOERING, A. E., EISNER, D. A. UND LEDERER, W. J. (1996). Cardiac Na-Ca exchange and pH. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 779:182–198.
- DOERING, A. E. UND LEDERER, W. J. (1994). The action of  $\text{Na}^+$  as a cofactor in the inhibition by cytoplasmic protons of the cardiac  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchanger in the guinea-pig. *Journal of Physiology*, 480(Pt 1):9–20.
- DOERING, A. E., NICOLL, D. A., LU, Y., LU, L., WEISS, J. N. UND PHILIPSON, K. D. (1998). Topology of a functionally important region of the cardiac  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger. *Journal of Biological Chemistry*, 273(2):778–783.
- DONG, H., DUNN, J. UND LYTTON, J. (2002). Stoichiometry of the cardiac  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger NCX1.1 measured in transfected HEK cells. *Biophys J*, 82(4):1943–1952.
- DURKIN, J. T., AHRENS, D. C., PAN, Y. C. UND REEVES, J. P. (1991). Purification and amino-terminal sequence of the bovine cardiac sodium-calcium exchanger: evidence for the presence of a signal sequence. *Archives of Biochemistry & Biophysics*, 290(2):369–375.
- EGGER, M. UND NIGGLI, E. (1999). Regulatory function of Na-Ca exchange in the heart: milestones and outlook. *Journal of Membrane Biology*, 168 Pt 2:107–130.

- EGGER, M. UND NIGGLI, E. (2000). Paradoxical block of the  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchanger by extracellular protons in guinea-pig ventricular myocytes. *Journal of Physiology*, 523 Pt 2:353–366.
- EGGER, M., RUKNUDIN, A., NIGGLI, E., LEDERER, W. J. UND SCHULZE, D. H. (1999).  $\text{Ni}^{2+}$  transport by the human  $\text{Na}^+$ / $\text{Ca}^{2+}$  exchanger expressed in SF9 cells. *American Journal of Physiology*, 276(5 Pt 1):C1184–1192.
- EHARA, T., MATSUOKA, S. UND NOMA, A. (1989). Measurement of reversal potential of  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchange current in single guinea-pig ventricular cells. *Journal of Physiology*, 410:227–249.
- ELBLE, R. C., WIDOM, J., GRUBER, A. D., ABDEL-GHANY, M., LEVINE, R., GOODWIN, A., CHENG, H. C. UND PAULI, B. U. (1997). Cloning and characterization of lung-endothelial cell adhesion molecule-1 suggest it is an endothelial chloride channel. *J Biol Chem*, 272(44):27853–27861.
- ELLIS-DAVIES, G. C. UND KAPLAN, J. H. (1994). Nitrophenyl-EGTA, a photolabile chelator that selectively binds  $\text{Ca}^{2+}$  with high affinity and releases it rapidly upon photolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(1):187–191.
- ELLIS-DAVIES, G. C., KAPLAN, J. H. UND BARSOTTI, R. J. (1996). Laser photolysis of caged calcium: rates of calcium release by nitrophenyl-EGTA and DM-nitrophen. *Biophysical Journal*, 70(2):1006–1016.
- ESCOBAR, A. L., VELEZ, P., KIM, A. M., CIFUENTES, F., FILL, M. UND VERGARA, J. L. (1997). Kinetic properties of DM-nitrophen and calcium indicators: Rapid transient response to flash photolysis. *Pflugers Archiv - European Journal of Physiology*, 434(5):615–631.
- EVANS, M. G. UND MARTY, A. (1986). Calcium-dependent chloride currents in isolated cells from rat lacrimal glands. *J Physiol*, 378:437–460.
- EVANS, M. G., MARTY, A., TAN, Y. P. UND TRAUTMANN, A. (1986). Blockage of  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{Cl}^-$  conductance by furosemide in rat lacrimal glands. *Pflugers Archiv - European Journal of Physiology*, 406(1):65–68.
- FONTANILLA, R. A. UND NUCCITELLI, R. (1998). Characterization of the sperm-induced calcium wave in xenopus eggs using confocal microscopy. *Biophys J*, 75(4):2079–2087.
- FRASER, S. P. (1997). Hyaluronan activates calcium-dependent chloride currents in xenopus oocytes. *FEBS Lett*, 404(1):56–60.
- FRIEDRICH, T., BAMBERG, E. UND NAGEL, G. (1996).  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase pump currents in giant excised patches activated by an ATP concentration jump. *Biophysical Journal*, 71(5):2486–2500.

- FUJIOKA, Y., KOMEDA, M. UND MATSUOKA, S. (2000). Stoichiometry of  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchange in inside-out patches excised from guinea-pig ventricular myocytes. *Journal of Physiology*, 523 Pt 2:339–351.
- FUORTES, M. UND HODGKIN, A. L. (1964). Change in time scale and sensitivity in the ommatidia of limulus. *Journal of Physiology*, 172:239–263.
- GADSBY, D. C., NODA, M., SHEPHERD, R. N. UND NAKAO, M. (1991). Influence of external monovalent cations on Na-Ca exchange current-voltage relationships in cardiac myocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 639:140–146.
- GANDHI, R., ELBLE, R. C., GRUBER, A. D., SCHREUR, K. D., JI, H. L., FULLER, C. M. UND PAULI, B. U. (1998). Molecular and functional characterization of a calcium-sensitive chloride channel from mouse lung. *J Biol Chem*, 273(48):32096–32101.
- GARCIA, M. L., SLAUGHTER, R. S., KING, V. F. UND KACZOROWSKI, G. J. (1988). Inhibition of sodium-calcium exchange in cardiac sarcolemmal membrane vesicles. 2. Mechanism of inhibition by bepridil. *Biochemistry*, 27(7):2410–2415.
- GOLDIN, A. L. UND SUMIKAWA, K. (1992). Preparation of RNA for injection into xenopus oocytes. *Methods in Enzymology*, 207:279–297.
- GOMEZ-HERNANDEZ, J. M., STUHMER, W. UND PAREKH, A. B. (1997). Calcium dependence and distribution of calcium-activated chloride channels in xenopus oocytes. *Journal of Physiology*, 502(Pt 3):569–574.
- GRELL, E., LEWITZKI, E., RUF, H., BAMBERG, E., ELLIS-DAVIES, G. C., KAPLAN, J. H. UND DE WEER, P. (1989). Caged- $\text{Ca}^{2+}$ : A new agent allowing liberation of free  $\text{Ca}^{2+}$  in biological systems by photolysis. *Cellular & Molecular Biology*, 35(5):515–522.
- GREWER, C. (1999). Investigation of the  $\alpha(1)$ -glycine receptor channel-opening kinetics in the submillisecond time domain. *Biophys J*, 77(2):727–738.
- GRUBER, A. D., ELBLE, R. C., JI, H. L., SCHREUR, K. D., FULLER, C. M. UND PAULI, B. U. (1998). Genomic cloning, molecular characterization, and functional analysis of human clca1, the first human member of the family of  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{Cl}^-$  channel proteins. *Genomics*, 54(2):200–214.
- GRUBER, A. D. UND PAULI, B. U. (1999). Molecular cloning and biochemical characterization of a truncated, secreted member of the human family of  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{Cl}^-$  channels. *Biochim Biophys Acta*, 1444(3):418–423.
- GRUBER, A. D., SCHREUR, K. D., JI, H. L., FULLER, C. M. UND PAULI, B. U. (1999). Molecular cloning and transmembrane structure of hCLCA2 from human lung, trachea, and mammary gland. *Am J Physiol*, 276(6 Pt 1):C1261–1270.
- GURDON, J. B., LANE, C. D., WOODLAND, H. R. UND MARBAIX, G. (1971). Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature*, 233(5316):177–182.



- GURDON, J. B. UND WICKENS, M. P. (1983). The use of xenopus oocytes for the expression of cloned genes. *Methods in Enzymology*, 101:370–386.
- GURNEY, A. M., TSIEN, R. Y. UND LESTER, H. A. (1987). Activation of a potassium current by a rapid photochemically generated step increase of intracellular calcium in rat sympathetic neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84:3496–3500.
- GUTFREUND, H. (1995). *Kinetics for the life sciences*. Cambridge University Press, New York.
- HAMILL, O. P., MARTY, A., NEHER, E., SAKMANN, B. UND SIGWORTH, F. J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 391(2):85–100.
- HAMILL, O. P. UND SAKMANN, B. (1981). A cell-free method for recording single-channel currents from biological membranes. *Journal of Physiology*, 312:41–42P.
- HARTZELL, H. C. (1996). Activation of different Cl currents in xenopus oocytes by Ca liberated from stores and by capacitative Ca influx. *J Gen Physiol*, 108(3):157–175.
- HE, Z., FENG, S., TONG, Q., HILGEMANN, D. W. UND PHILIPSON, K. D. (2000). Interaction of PIP<sub>2</sub> with the XIP region of the cardiac Na/Ca exchanger. *American Journal of Physiology*, 278(4):C661–666.
- HE, Z., TONG, Q., QUEDNAU, B. D., PHILIPSON, K. D. UND HILGEMANN, D. W. (1998). Cloning, expression, and characterization of the squid Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger (NCX-SQ1). *Journal of General Physiology*, 111(6):857–873.
- HEDIGER, M. A., COADY, M. J., IKEDA, T. S. UND WRIGHT, E. M. (1987). Expression cloning and cDNA sequencing of the Na<sup>+</sup>/glucose co-transporter. *Nature*, 330(6146):379–381.
- HILGEMANN, D. W. (1989). Giant excised cardiac sarcolemmal membrane patches: sodium and sodium-calcium exchange currents. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 415(2):247–249.
- HILGEMANN, D. W. (1990). Regulation and deregulation of cardiac Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange in giant excised sarcolemmal membrane patches. *Nature*, 344(6263):242–245.
- HILGEMANN, D. W. (1995). The giant membrane patch. In Sakmann, B. und Neher, E., Herausgeber, *Single-Channel Recording*, Seiten 307–327. Plenum Press, New York, 2. Ausgabe.
- HILGEMANN, D. W. (1996). Unitary cardiac Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> exchange current magnitudes determined from channel-like noise and charge movements of ion transport. *Biophysical Journal*, 71(2):759–768.

- HILGEMANN, D. W. (1997). Cytoplasmic ATP-dependent regulation of ion transporters and channels: mechanisms and messengers. *Annual Review of Physiology*, 59:193–220.
- HILGEMANN, D. W. UND BALL, R. (1996). Regulation of cardiac  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  exchange and KATP potassium channels by  $\text{PIP}_2$ . *Science*, 273(5277):956–959.
- HILGEMANN, D. W., MATSUOKA, S., NAGEL, G. A. UND COLLINS, A. (1992). Steady-state and dynamic properties of cardiac sodium-calcium exchange. Sodium-dependent in-activation. *Journal of General Physiology*, 100(6):905–932.
- HILGEMANN, D. W., NICOLL, D. A. UND PHILIPSON, K. D. (1991). Charge movement during  $\text{Na}^+$  translocation by native and cloned cardiac  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger. *Nature*, 352(6337):715–718.
- HILLE, B. (1992). *Ionic Channels of Excitable Membranes*. Sinauer Ass., Sunderland, Mass., 2. Ausgabe.
- HOGG, R. C., WANG, Q. UND LARGE, W. A. (1993). Time course of spontaneous calcium-activated chloride currents in smooth muscle cells from the rabbit portal vein. *J Physiol*, 464:15–31.
- HORN, R. UND PATLAK, J. (1980). Single channel currents from excised patches of muscle membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(11):6930–6934.
- HRYSKO, L. V., NICOLL, D. A., WEISS, J. N. UND PHILIPSON, K. D. (1993). Biosynthesis and initial processing of the cardiac sarcolemmal  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1151(1):35–42.
- ISHIKAWA, T. (1996). A bicarbonate- and weak acid-permeable chloride conductance controlled by cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  and ATP in rat submandibular acinar cells. *J Membr Biol*, 153(2):147–159.
- ISHIKAWA, T. UND COOK, D. I. (1993). A  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{Cl}^-$  current in sheep parotid secretory cells. *J Membr Biol*, 135(3):261–271.
- IWAMOTO, T., NAKAMURA, T. Y., PAN, Y., UEHARA, A., IMANAGA, I. UND SHIGEKAWA, M. (1999a). Unique topology of the internal repeats in the cardiac  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger. *FEBS Letters*, 446(2-3):264–268.
- IWAMOTO, T. UND SHIGEKAWA, M. (1998). Differential inhibition of  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger isoforms by divalent cations and isothiourea derivative. *American Journal of Physiology*, 275(2 Pt 1):C423–430.
- IWAMOTO, T., UEHARA, A., IMANAGA, I. UND SHIGEKAWA, M. (2000). The  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger NCX1 has oppositely oriented reentrant loop domains that contain conserved aspartic acids whose mutation alters its apparent  $\text{Ca}^{2+}$  affinity. *Journal of Biological Chemistry*, 275(49):38571–38580.

- IWAMOTO, T., UEHARA, A., NAKAMURA, T. Y., IMANAGA, I. UND SHIGEKAWA, M. (1999b). Chimeric analysis of  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchangers NCX1 and NCX3 reveals structural domains important for differential sensitivity to external  $\text{Ni}^{2+}$  or  $\text{Li}^+$ . *Journal of Biological Chemistry*, 274(33):23094–23102.
- IWAMOTO, T., WATANO, T. UND SHIGEKAWA, M. (1996). A novel isothiourea derivative selectively inhibits the reverse mode of  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange in cells expressing NCX1. *Journal of Biological Chemistry*, 271(37):22391–22397.
- IWATA, T., KRAEV, A., GUERINI, D. UND CARAFOLI, E. (1996). A new splicing variant in the frog heart sarcolemmal Na-Ca exchanger creates a putative ATP-binding site. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 779:37–45.
- JAFFE, L. A. UND CROSS, N. L. (1986). Electrical regulation of sperm-egg fusion. *Annual Review of Physiology*, 48:191–200.
- JAFFE, L. A., KADO, R. T. UND MUNCY, L. (1985). Propagating potassium and chloride conductances during activation and fertilization of the egg of the frog, *Rana pipiens*. *J Physiol*, 368:227–242.
- JANSSEN, L. J. UND SIMS, S. M. (1994). Spontaneous transient inward currents and rhythmicity in canine and guinea-pig tracheal smooth muscle cells. *Pflügers Arch*, 427(5–6):473–480.
- JENTSCH, T. J., FRIEDRICH, T., SCHRIEVER, A. UND YAMADA, H. (1999). The ClC chloride channel family. *Pflügers Arch*, 437(6):783–795.
- KACZOROWSKI, G. J., SLAUGHTER, R. S., KING, V. F. UND GARCIA, M. L. (1989). Inhibitors of sodium-calcium exchange: identification and development of probes of transport activity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 988(2):287–302.
- KAPLAN, J. H. (1990). Photochemical manipulation of divalent cation levels. *Annual Review of Physiology*, 52:897–914.
- KAPLAN, J. H. UND ELLIS-DAVIES, G. C. (1988). Photolabile chelators for the rapid photorelease of divalent cations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(17):6571–6575.
- KAPLAN, J. H., FORBUSH, B., R. UND HOFFMAN, J. F. (1978). Rapid photolytic release of adenosine 5'-triphosphate from a protected analogue: utilization by the Na:K pump of human red blood cell ghosts. *Biochemistry*, 17(10):1929–1935.
- KAPPL, M. (1997). *Untersuchungen zur Kinetik des  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers aus Herzmuskelzellen*. Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt (Main).
- KAPPL, M. UND HARTUNG, K. (1996a). Kinetics of Na-Ca exchange current after a  $\text{Ca}^{2+}$  concentration jump. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 779:290–292.

- KAPPL, M. UND HARTUNG, K. (1996b). Rapid charge translocation by the cardiac  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchanger after a  $\text{Ca}^{2+}$  concentration jump. *Biophysical Journal*, 71(5):2473–2485.
- KAPPL, M., NAGEL, G. UND HARTUNG, K. (2001). Voltage and  $\text{Ca}^{2+}$  dependence of pre-steady-state currents of the Na-Ca exchanger generated by  $\text{Ca}^{2+}$  concentration jumps. *Biophys J*, 81(5):2628–2638.
- KHANANSHVILI, D. (1990). Distinction between the two basic mechanisms of cation transport in the cardiac  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchange system. *Biochemistry*, 29(10):2437–2442.
- KHANANSHVILI, D., SHAULOV, G., WEIL-MASLANSKY, E. UND BAAZOV, D. (1995). Positively charged cyclic hexapeptides, novel blockers for the cardiac sarcolemma  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchanger. *Journal of Biological Chemistry*, 270(27):16182–16188.
- KHANANSHVILI, D., WEIL-MASLANSKY, E. UND BAAZOV, D. (1991). Kinetics and mechanism: Modulation of ion transport in the cardiac sarcolemma sodium-calcium exchanger by protons, monovalent ions, and temperature. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 779:217–235.
- KIDD, J. F. UND THORN, P. (2000). Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Cl}^-$  channel activation in secretory cells. *Annu Rev Physiol*, 62:493–513.
- KIDD, J. F. UND THORN, P. (2001). The properties of the secretagogue-evoked chloride current in mouse pancreatic acinar cells. *Pflugers Arch*, 441(4):489–497.
- KIMURA, J. (1996). Effects of external  $\text{Mg}^{2+}$  on the Na-Ca-exchange current in guinea pig cardiac myocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 779:515–520.
- KIMURA, J., MIYAMAE, S. UND NOMA, A. (1987). Identification of sodium-calcium exchange current in single ventricular cells of guinea-pig. *Journal of Physiology*, 384:199–222.
- KIMURA, J., NOMA, A. UND IRISAWA, H. (1986). Na-Ca exchange current in mammalian heart cells. *Nature*, 319(6054):596–597.
- KIMURA, M., JEANCLOS, E. M., DONNELLY, R. J., LYTTON, J., REEVES, J. P. UND AVIV, A. (1999). Physiological and molecular characterization of the  $\text{Na}^+$ / $\text{Ca}^{2+}$  exchanger in human platelets. *American Journal of Physiology*, 277(3 Pt 2):H911–917.
- KLEYMAN, T. R. UND CRAGOE, E. J., J. (1988). Amiloride and its analogs as tools in the study of ion transport. *Journal of Membrane Biology*, 105(1):1–21.
- KLINE, D., SIMONCINI, L., MANDEL, G., MAUE, R. A., KADO, R. T. UND JAFFE, L. A. (1988). Fertilization events induced by neurotransmitters after injection of mRNA in xenopus eggs. *Science*, 241(4864):464–467.
- KOFUJI, P., HADLEY, R. W., KIEVAL, R. S., LEDERER, W. J. UND SCHULZE, D. H. (1992). Expression of the Na-Ca exchanger in diverse tissues: a study using the cloned human cardiac Na-Ca exchanger. *American Journal of Physiology*, 263(6 Pt 1):C1241–1249.

- KOFUJI, P., LEDERER, W. J. UND SCHULZE, D. H. (1994). Mutually exclusive and cassette exons underlie alternatively spliced isoforms of the Na/Ca exchanger. *Journal of Biological Chemistry*, 269(7):5145–5149.
- KOMIYA, T., TANIGAWA, Y. UND HIROHASHI, S. (1999). Cloning and identification of the gene GOB-5, which is expressed in intestinal goblet cells in mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 255(2):347–351.
- KOMURO, I., WENNINGER, K. E., PHILIPSON, K. D. UND IZUMO, S. (1992). Molecular cloning and characterization of the human cardiac  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(10):4769–4773.
- KOUMI, S., SATO, R. UND ARAMAKI, T. (1994). Characterization of the calcium-activated chloride channel in isolated guinea-pig hepatocytes. *J Gen Physiol*, 104(2):357–373.
- KRAFTE, D. S. UND LESTER, H. A. (1992). Use of stage II-III xenopus oocytes to study voltage-dependent ion channels. *Methods in Enzymology*, 207:339–345.
- KUNZELMANN, K., MALL, M., BRIEL, M., HIPPER, A., NITSCHKE, R., RICKEN, S. UND GREGER, R. (1997). The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator attenuates the endogenous  $\text{Ca}^{2+}$  activated  $\text{Cl}^-$  conductance of xenopus oocytes. *Pflügers Arch*, 435(1):178–181.
- KURUMA, A. UND HARTZELL, H. C. (2000). Bimodal control of a  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{Cl}^-$  channel by different  $\text{Ca}^{2+}$  signals. *J Gen Physiol*, 115(1):59–80.
- LADILOV, Y., HAFFNER, S., BALSER-SCHAFFER, C., MAXEINER, H. UND PIPER, H. M. (1999). Cardioprotective effects of KB-R7943: a novel inhibitor of the reverse mode of  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger. *American Journal of Physiology*, 276(6 Pt 2):H1868–1876.
- LATORRE, R. (1994). Molecular workings of large conductance (maxi)  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels. In Peracchia, C., Herausgeber, *Handbook of Membrane Channels*, Seiten 79–102. Academic Press, San Diego.
- LÄUGER, P. (1987). Voltage dependence of sodium-calcium exchange: predictions from kinetic models. *Journal of Membrane Biology*, 99(1):1–11.
- LÄUGER, P. (1991). *Electrogenic Ion Pumps*. Sinauer Ass., Sunderland, Mass., 1. Ausgabe.
- LEDVORA, R. F. UND HEGYVARY, C. (1983). Dependence of  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange and  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchange on monovalent cations. *Biochimica et Biophysica Acta*, 729(1):123–136.
- LEE, D., HA, S., KHO, Y., KIM, J., CHO, K., BAIK, M. UND CHOI, Y. (1999). Induction of mouse  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive chloride channel 2 gene during involution of mammary gland. *Biochem Biophys Res Commun*, 264(3):933–937.

- LEVITSKY, D. O., NICOLL, D. A. UND PHILIPSON, K. D. (1994). Identification of the high affinity  $\text{Ca}^{2+}$ -binding domain of the cardiac  $\text{Na}^{+}$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchanger. *Journal of Biological Chemistry*, 269(36):22847–22852.
- LI, J. M. UND KIMURA, J. (1990). Translocation mechanism of Na-Ca exchange in single cardiac cells of guinea pig. *Journal of General Physiology*, 96(4):777–788.
- LI, J. M. UND KIMURA, J. (1991). Translocation mechanism of cardiac Na-Ca exchange. *Ann N Y Acad Sci*, 639:48–60.
- LI, Z., MATSUOKA, S., HRYSHKO, L. V., NICOLL, D. A., BERSOHN, M. M., BURKE, E. P., LIFTON, R. P. UND PHILIPSON, K. D. (1994). Cloning of the NCX2 isoform of the plasma membrane  $\text{Na}^{+}$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchanger. *Journal of Biological Chemistry*, 269(26):17434–17439.
- LI, Z., NICOLL, D. A., COLLINS, A., HILGEMANN, D. W., FILOTEO, A. G., PENNISTON, J. T., WEISS, J. N., TOMICH, J. M. UND PHILIPSON, K. D. (1991). Identification of a peptide inhibitor of the cardiac sarcolemmal  $\text{Na}^{+}$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchanger. *Journal of Biological Chemistry*, 266(2):1014–1020.
- LINCK, B., QIU, Z., HE, Z., TONG, Q., HILGEMANN, D. W. UND PHILIPSON, K. D. (1998). Functional comparison of the three isoforms of the  $\text{Na}^{+}$ / $\text{Ca}^{2+}$  exchanger (NCX1, NCX2, NCX3). *American Journal of Physiology*, 274(2 Pt 1):C415–423.
- LINGLE, C. J., SOLARO, C. R., PRAKRIYA, M. UND DING, J. P. (1996). Calcium-activated potassium channels in adrenal chromaffin cells. In Narahashi, T., Herausgeber, *Ion channels*, Band 4, Seiten 261–301. Plenum Press, New York.
- LIPP, P., SCHWALLER, B. UND NIGGLI, E. (1995). Specific inhibition of Na-Ca exchange function by antisense oligodeoxynucleotides [published erratum appears in febs lett 1995 aug 21;370(3):280]. *FEBS Letters*, 364(2):198–202.
- MACHACA, K. UND HARTZELL, H. C. (1998). Asymmetrical distribution of Ca-activated Cl channels in xenopus oocytes [published erratum appears in biophys j 1998 jun;74(6):3313]. *Biophysical Journal*, 74(3):1286–1295.
- MACHACA, K. UND HARTZELL, H. C. (1999). Reversible Ca gradients between the subplasmalemma and cytosol differentially activate Ca-dependent Cl currents. *J Gen Physiol*, 113(2):249–266.
- MAGLEBY, K. L. (2001). Kinetic gating mechanisms for BK channels: When complexity leads to simplicity. *Journal of General Physiology*, 118:583–587.
- MARTY, A., TAN, Y. P. UND TRAUTMANN, A. (1984). Three types of calcium-dependent channel in rat lacrimal glands. *J Physiol*, 357:293–325.
- MATSUOKA, S. UND HILGEMANN, D. W. (1992). Steady-state and dynamic properties of cardiac sodium-calcium exchange. Ion and voltage dependencies of the transport cycle. *Journal of General Physiology*, 100(6):963–1001.

- MATSUOKA, S., NICOLL, D. A., HE, Z. UND PHILIPSON, K. D. (1997). Regulation of cardiac  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchanger by the endogenous XIP region. *Journal of General Physiology*, 109(2):273–286.
- MATSUOKA, S., NICOLL, D. A., HRYSHKO, L. V., LEVITSKY, D. O., WEISS, J. N. UND PHILIPSON, K. D. (1995). Regulation of the cardiac  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchanger by  $\text{Ca}^{2+}$ . Mutational analysis of the  $\text{Ca}^{2+}$ -binding domain. *Journal of General Physiology*, 105(3):403–420.
- MATSUOKA, S., NICOLL, D. A., REILLY, R. F., HILGEMANN, D. W. UND PHILIPSON, K. D. (1993). Initial localization of regulatory regions of the cardiac sarcolemmal  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchanger. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(9):3870–3874.
- MCCRAY, J. A. UND TRENTHAM, D. R. (1989). Properties and uses of photoreactive caged compounds. *Annual Review of Biophysics & Biophysical Chemistry*, 18:239–270.
- METHFESSEL, C., WITZEMANN, V., TAKAHASHI, T., MISHINA, M., NUMA, S. UND SAKMANN, B. (1986). Patch clamp measurements on xenopus laevis oocytes: currents through endogenous channels and implanted acetylcholine receptor and sodium channels. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 407(6):577–588.
- MILANICK, M. A. UND FRAME, D. S. (1991). Kinetic models of Na-Ca exchange in ferret red blood cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 639:604–615.
- MILEDI, R. UND PARKER, I. (1984). Chloride current induced by injection of calcium into xenopus oocytes. *Journal of Physiology*, 357:173–183.
- MILLER, A. J. UND ZHOU, J. J. (2000). Xenopus oocytes as an expression system for plant transporters. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1465(1-2):343–358.
- MIURA, Y. UND KIMURA, J. (1989). Sodium-calcium exchange current. dependence on internal Ca and Na and competitive binding of external Na and Ca. *Journal of General Physiology*, 93(6):1129–1145.
- MORRIS, A. P. UND FRIZZELL, R. A. (1993).  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{Cl}^-$  channels in undifferentiated human colonic cells (HT-29). I. Single-channel properties. *American Journal of Physiology*, 264(4 Pt 1):C968–976.
- MULLINS, L. J. (1979). The generation of electric currents in cardiac fibers by Na/Ca exchange. *Am J Physiol*, 236(3):C103–110.
- MULLINS, L. J. (1991). Is stoichiometry constant in Na-Ca exchange? *Annals of the New York Academy of Sciences*, 639:96–98.
- NAGEL, G., MOCKEL, B., BULDT, G. UND BAMBERG, E. (1995). Functional expression of bacteriorhodopsin in oocytes allows direct measurement of voltage dependence of light induced  $\text{H}^+$  pumping. *FEBS Letters*, 377(2):263–266.

- NAGEL, G., SZELLAS, T., RIORDAN, J. R., FRIEDRICH, T. UND HARTUNG, K. (2001). Non-specific activation of the epithelial sodium channel by the CFTR chloride channel. *EMBO Rep*, 2(3):249–254.
- NEHER, E. (1992). Correction for liquid junction potentials in patch clamp experiments. *Methods in Enzymology*, 207:123–131.
- NEHER, E. (1995). Voltage offsets in patch-clamp experiments. In Sakmann, B. und Neher, E., Herausgeber, *Single-Channel Recording*, Seiten 147–153. Plenum Press, New York, 2. Ausgabe.
- NEHER, E. UND SAKMANN, B. (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*, 260(5554):799–802.
- NEHER, E., SAKMANN, B. UND STEINBACH, J. (1978). The extracellular patch clamp: A method for resolving currents through individual open channels in biological membranes. *PfluegersArchiv European Journal of Physiology*, 375:219–228.
- NICOLL, D. A., HRYSHKO, L. V., MATSUOKA, S., FRANK, J. S. UND PHILIPSON, K. D. (1996). Mutation of amino acid residues in the putative transmembrane segments of the cardiac sarcolemmal  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchanger. *Journal of Biological Chemistry*, 271(23):13385–13391.
- NICOLL, D. A., LONGONI, S. UND PHILIPSON, K. D. (1990). Molecular cloning and functional expression of the cardiac sarcolemmal  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchanger. *Science*, 250(4980):562–565.
- NICOLL, D. A. UND PHILIPSON, K. D. (1991). Molecular studies of the cardiac sarcolemmal sodium-calcium exchanger. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 639:181–188.
- NIGGLI, E. UND LEDERER, W. J. (1991a). Molecular operations of the sodium-calcium exchanger revealed by conformation currents [see comments]. *Nature*, 349(6310):621–624.
- NIGGLI, E. UND LEDERER, W. J. (1991b). Photorelease of  $\text{Ca}^{2+}$  produces Na-Ca exchange currents and Na-Ca exchange “gating” currents. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 639:61–70.
- NILIUS, B., PRENEN, J., SZUCS, G., WEI, L., TANZI, F., VOETS, T. UND DROOGMANS, G. (1997). Calcium-activated chloride channels in bovine pulmonary artery endothelial cells. *Journal of Physiology*, 498(Pt 2):381–396.
- OMELCHENKO, A. UND HRYSHKO, L. V. (1996). Current-voltage relations and steady-state characteristics of  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchange: Characterization of the eight-state consecutive transport model. *Biophysical Journal*, 71(4):1751–1763.



- PAPASSOTIRIOU, J., EGGERMONT, J., DROOGMANS, G. UND NILIUS, B. (2001).  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{Cl}^-$  channels in ehrlich ascites tumor cells are distinct from mCLCA1, 2 and 3. *PfluegersArchiv European Journal of Physiology*, DOI 10.1007/s004240100526 (Online first).
- PAREKH, A. B. UND PENNER, R. (1997). Store depletion and calcium influx. *Physiological Reviews*, 77(4):901–930.
- PETERSEN, C. C. UND BERRIDGE, M. J. (1994). The regulation of capacitative calcium entry by calcium and protein kinase C in xenopus oocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 269(51):32246–32253.
- PHILIPSON, K. D., NICOLL, D. A., MATSUOKA, S., HRYSHKO, L. V., LEVITSKY, D. O. UND WEISS, J. N. (1996). Molecular regulation of the  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchanger. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 779:20–28.
- PITTS, B. J. (1979). Stoichiometry of sodium-calcium exchange in cardiac sarcolemmal vesicles. Coupling to the sodium pump. *Journal of Biological Chemistry*, 254(14):6232–6235.
- POWELL, T., NOMA, A., SHIOYA, T. UND KOZLOWSKI, R. Z. (1993). Turnover rate of the cardiac  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchanger in guinea-pig ventricular myocytes. *Journal of Physiology*, 472:45–53.
- PRINSEN, C. F., SZERENCSEI, R. T. UND SCHNETKAMP, P. P. (2000). Molecular cloning and functional expression of the potassium-dependent sodium-calcium exchanger from human and chicken retinal cone photoreceptors. *J Neurosci*, 20(4):1424–1434.
- PRIORI, S. G., BARHANIN, J., HAUER, R. N. W., HAVERKAMP, W., JONGSMA, H. J., KLEBER, A. G., MCKENNA, W. J., RODEN, D. M., RUDY, Y., SCHWARTZ, K., SCHWARTZ, P. J., TOWBIN, J. A. UND WILDE, A. (1999). Genetic and molecular basis of cardiac arrhythmias. *European Heart Journal*, 20:174–195.
- PUSCH, M. (1996). Knocking on channel's door. The permeating chloride ion acts as the gating charge in  $\text{ClC-0}$ . *J Gen Physiol*, 108(4):233–236.
- PUSCH, M., LUDEWIG, U., REHFELDT, A. UND JENTSCH, T. J. (1995). Gating of the voltage-dependent chloride channel  $\text{ClC-0}$  by the permeant anion. *Nature*, 373(6514):527–531.
- PUTNEY, J. W. (2000). *Calcium Signaling*. CRC Press, Boca Raton.
- QIU, Z., NICOLL, D. A. UND PHILIPSON, K. D. (2001). Helix packing of functionally important regions of the cardiac  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchanger. *Journal of Biological Chemistry*, 276(1):194–199.
- QU, Z. UND HARTZELL, H. C. (2000). Anion permeation in  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{Cl}^-$  channels. *J Gen Physiol*, 116(6):825–844.

- QU, Z. UND HARTZELL, H. C. (2001). Functional geometry of the permeation pathway of  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{Cl}^-$  channels inferred from analysis of voltage-dependent block. *J Biol Chem*, 276(21):18423–18429.
- REEVES, J. P. UND HALE, C. C. (1984). The stoichiometry of the cardiac sodium-calcium exchange system. *Journal of Biological Chemistry*, 259(12):7733–7739.
- REEVES, J. P. UND SUTKO, J. L. (1983). Competitive interactions of sodium and calcium with the sodium-calcium exchange system of cardiac sarcolemmal vesicles. *Journal of Biological Chemistry*, 258(5):3178–3182.
- REIFARTH, F. W., AMASHEH, S., CLAUSS, W. UND WEBER, W. (1997). The  $\text{Ca}^{2+}$ -inactivated  $\text{Cl}^-$  channel at work: selectivity, blocker kinetics and transport visualization. *J Membr Biol*, 155(1):95–104.
- REILANDER, H., ACHILLES, A., FRIEDEL, U., MAUL, G., LOTTSPEICH, F. UND COOK, N. J. (1992). Primary structure and functional expression of the Na/Ca,K-exchanger from bovine rod photoreceptors. *EMBO Journal*, 11(5):1689–1695.
- REILLY, R. F. UND SHUGRUE, C. A. (1992). cDNA cloning of a renal  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchanger. *American Journal of Physiology*, 262(6 Pt 2):F1105–1109.
- RETTINGER, J. (1994). *Elektrophysiologische Untersuchungen endogener und exogener Transportproteine in der Membran von Oozyten des afrikanischen Krallenfroschs Xenopus laevis mit Hilfe einer neuen Variante der Patch-Clamp-Methode*. Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt (Main).
- RETTINGER, J. (1999). Novel properties of the depolarization-induced endogenous sodium conductance in the xenopus laevis oocyte. *Pflugers Archiv - European Journal of Physiology*, 437(6):917–924.
- RETTINGER, J., VASILETS, L. A., ELSNER, S. UND SCHWARZ, W. (1994). Analyzing the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -pump in outside-out giant membrane patches of *Xenopus* oocytes. In Bamberg, E. und Schoner, W., Herausgeber, *The Sodium Pump*, Seiten 553–560. Steinkopff, Darmstadt.
- REUTER, H. UND SEITZ, N. (1968). The dependence of calcium efflux from cardiac muscle on temperature and external ion composition. *Journal of Physiology*, 195(2):451–470.
- ROMERO, M. F., KANAI, Y., GUNSHIN, H. UND HEDIGER, M. A. (1998). Expression cloning using xenopus laevis oocytes. *Methods in Enzymology*, 296:17–52.
- RUKNUDIN, A., VALDIVIA, C., KOFUJI, P., LEDERER, W. J. UND SCHULZE, D. H. (1997).  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger in drosophila: cloning, expression, and transport differences. *Am J Physiol*, 273(1 Pt 1):C257–265.
- RYCHKOV, G. Y., PUSCH, M., ROBERTS, M. L., JENTSCH, T. J. UND BRETAG, A. H. (1998). Permeation and block of the skeletal muscle chloride channel,  $\text{ClC-1}$ , by foreign anions. *J Gen Physiol*, 111(5):653–665.

- SAGAR, A. UND RAKOWSKI, R. F. (1994). Access channel model for the voltage dependence of the forward-running  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  pump. *J Gen Physiol*, 103(5):869–893.
- SCHLIEF, T. UND HEINEMANN, S. H. (1995).  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced chloride currents are indicative of an endogenous  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange mechanism in xenopus oocytes. *Journal of Physiology*, 486(Pt 1):123–130.
- SCHNETKAMP, P. P., BASU, D. K. UND SZERENCSEI, R. T. (1989).  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange in bovine rod outer segments requires and transports  $\text{K}^+$ . *American Journal of Physiology*, 257(1 Pt 1):C153–157.
- SCHULZE, D. H., KOFUJI, P., VALDIVIA, C., HE, S., LUO, S., RUKNUDIN, A., WISEL, S., KIRBY, M. S., DUBELL, W. UND LEDERER, W. J. (1996). Alternative splicing of the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger gene, NCX1. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 779:46–57.
- Sherman-Gold, R., Herausgeber (1993). *The Axon Guide for Electrophysiology & Biophysics Laboratory Techniques*. Axon Instruments, Inc., Foster City, CA.
- SIGWORTH, F. J. UND NEHER, E. (1980). Single  $\text{Na}^+$  channel currents observed in cultured rat muscle cells. *Nature*, 287(5781):447–449.
- SLAUGHTER, R. S., GARCIA, M. L., CRAGOE, E. J., J., REEVES, J. P. UND KACZOROWSKI, G. J. (1988). Inhibition of sodium-calcium exchange in cardiac sarcolemmal membrane vesicles. 1. Mechanism of inhibition by amiloride analogues. *Biochemistry*, 27(7):2403–2409.
- SLAUGHTER, R. S., SUTKO, J. L. UND REEVES, J. P. (1983). Equilibrium calcium-calcium exchange in cardiac sarcolemmal vesicles. *Journal of Biological Chemistry*, 258(5):3183–3190.
- SMITH, J. B., CRAGOE, E. J., J. UND SMITH, L. (1987).  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  antiport in cultured arterial smooth muscle cells. Inhibition by magnesium and other divalent cations. *Journal of Biological Chemistry*, 262(25):11988–11994.
- SOREQ, H. UND SEIDMAN, S. (1992). Xenopus oocyte microinjection: from gene to protein. *Methods in Enzymology*, 207:225–265.
- STÜHMER, W., ROBERTS, W. M. UND ALMERS, W. (1983). The loose patch. In Sakmann, B. und Neher, E., Herausgeber, *Single-Channel Recording*, Seiten 123–132. Plenum Press, New York, 1. Ausgabe.
- SUMIKAWA, K., HOUGHTON, M., EMTAGE, J. S., RICHARDS, B. M. UND BARNARD, E. A. (1981). Active multi-subunit ach receptor assembled by translation of heterologous mRNA in xenopus oocytes. *Nature*, 292(5826):862–864.
- SWANSON, R. UND FOLANDER, K. (1992). In vitro synthesis of RNA for expression of ion channels in xenopus oocytes. *Methods in Enzymology*, 207:310–319.

- TAKAHASHI, T., NEHER, E. UND SAKMANN, B. (1987). Rat brain serotonin receptors in xenopus oocytes are coupled by intracellular calcium to endogenous channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(14):5063–5067.
- TASHIRO, M., KONISHI, M., IWAMOTO, T., SHIGEKAWA, M. UND KURIHARA, S. (2000). Transport of magnesium by two isoforms of the  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchanger expressed in CCL39 fibroblasts. *Pflugers Archiv - European Journal of Physiology*, 440(6):819–827.
- TAYLOR, M. A., JOHNSON, A. D. UND SMITH, L. D. (1985). Growing xenopus oocytes have spare translational capacity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(19):6586–6589.
- TEN EICK, R. E., WHALLEY, D. W. UND RASMUSSEN, H. H. (1992). Connections: heart disease, cellular electrophysiology, and ion channels. *Faseb J*, 6(8):2568–2580.
- TRAC, M., DYCK, C., HNATOWICH, M., OMELCHENKO, A. UND HRYSHKO, L. V. (1997). Transport and regulation of the cardiac  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchanger, NCX1. Comparison between  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Ba}^{2+}$ . *Journal of General Physiology*, 109(3):361–369.
- TROSPER, T. L. UND PHILIPSON, K. D. (1983). Effects of divalent and trivalent cations on  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchange in cardiac sarcolemmal vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 731(1):63–68.
- TSIEN, R. Y. UND ZUCKER, R. S. (1986). Control of cytoplasmic calcium with photolabile tetracarboxylate 2-nitrobenzhydrol chelators. *Biophysical Journal*, 50(5):843–853.
- TSOI, M., RHEE, K. H., BUNGARD, D., LI, X. F., LEE, S. L., AUER, R. N. UND LYTTON, J. (1998). Molecular cloning of a novel potassium-dependent sodium-calcium exchanger from rat brain. *Journal of Biological Chemistry*, 273(7):4155–4162.
- TSURUYA, Y., BERSOHN, M. M., LI, Z., NICOLL, D. A. UND PHILIPSON, K. D. (1994). Molecular cloning and functional expression of the guinea pig cardiac  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchanger. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1196(1):97–99.
- TZOUNOPOULOS, T., MAYLIE, J. UND ADELMAN, J. P. (1995). Induction of endogenous channels by high levels of heterologous membrane proteins in xenopus oocytes. *Biophysical Journal*, 69(3):904–908.
- VAN RENTERGHEM, C. UND LAZDUNSKI, M. (1993). Endothelin and vasopressin activate low conductance chloride channels in aortic smooth muscle cells. *Pflugers Arch*, 425(1-2):156–163.
- WANG, Y. X. UND KOTLIKOFF, M. I. (1997). Inactivation of calcium-activated chloride channels in smooth muscle by calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(26):14918–14923.

- WATZKE, N. (2001). *Untersuchungen zum molekularen Mechanismus des neuronalen Glutamattransports EAAC1*. Doktorarbeit, Johann Wolfgang Goethe-Universität.
- WEBER, C. R., GINSBURG, K. S., PHILIPSON, K. D., SHANNON, T. R. UND BERS, D. M. (2001). Allosteric regulation of Na/Ca exchange current by cytosolic Ca in intact cardiac myocytes. *J Gen Physiol*, 117(2):119–131.
- WEBER, W. (1999). Ion currents of xenopus laevis oocytes: state of the art. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1421(2):213–233.
- WEI, L., VANKEERBERGHEN, A., CUPPENS, H., EGGERMONT, J., CASSIMAN, J.-J., DROOGMANS, G. UND NILIUS, B. (2001). The C-terminal part of the R-domain, but not the PDZ binding motif, of CFTR is involved in interaction with Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channels. *PfluegersArchiv European Journal of Physiology*, DOI 10.1007/s004240100531(Online first).
- WHITE, M. M. UND AYLWIN, M. (1990). Niflumic and flufenamic acids are potent reversible blockers of Ca<sup>2+</sup>- activated Cl<sup>-</sup> channels in xenopus oocytes. *Mol Pharmacol*, 37(5):720–724.
- WU, G. UND HAMILL, O. P. (1992). NPPB block of Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> currents in xenopus oocytes. *Pflugers Arch*, 420(2):227–229.
- XUE, X. H., HRYSHKO, L. V., NICOLL, D. A., PHILIPSON, K. D. UND TIBBITS, G. F. (1999). Cloning, expression, and characterization of the trout cardiac Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger. *American Journal of Physiology*, 277(4 Pt 1):C693–700.
- YOUNG, G. P., YOUNG, J. D., DESHPANDE, A. K., GOLDSTEIN, M., KOIDE, S. S. UND COHN, Z. A. (1984). A Ca<sup>2+</sup>-activated channel from xenopus laevis oocyte membranes reconstituted into planar bilayers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(16):5155–5159.
- ZUCKER, R. S. (1992). Effects of photolabile calcium chelators on fluorescent calcium indicators. *Cell Calcium*, 13(1):29–40.
- ZUCKER, R. S. (1993). The calcium concentration clamp: Spikes and reversible pulses using the photolabile chelator DM-nitrophen. *Cell Calcium*, 14(2):87–100.
- ZYGMUNT, A. C. (1994). Intracellular calcium activates a chloride current in canine ventricular myocytes. *American Journal of Physiology*, 267(5 Pt 2):H1984–1995.



## Danksagung

**Bedanken** möchte ich mich bei ...

... Prof. Dr. Ernst Bamberg für die Möglichkeit, in seiner Abteilung die Doktorarbeit durchführen zu können.

... Dr. Klaus Hartung für die Themenstellung, die persönliche Betreuung und Unterstützung während der Doktorarbeit.

... Dr. Christof Grewer für die Hilfe und stete Diskussionsbereitschaft bei allen Fragen zur Kinetik, zur Patch-Clamp-Technik, zur Photolyse von *caged*-Substraten und zu Membranproteinen im Allgemeinen.

... bei Gudrun Sauer, mit der ich das Labor geteilt habe, für die vielen lustigen Stunden und für das Mitleid, wenn meine Photolysemessungen nicht geklappt haben.

... bei Natalie Watzke, die dafür gesorgt hat, dass mir die Dinge während der Zeit der Doktorarbeit nicht über den Kopf gewachsen sind.

... Verena Pintschovius, für die mühevolle Klonierung des  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

... der gesamten Arbeitsgruppe Bamberg für das hervorragende Arbeitsklima und die freundschaftliche Zusammenarbeit.

... Prof. Dr. Wässle für die Übernahme des Korreferats.

## Lebenslauf

Name                      Andreas Haase  
geboren am              25.01.1971  
                              in Oldenburg (Oldb.)

## Schulausbildung

1977 – 1981              Grundschule Nordenham-Blexen  
1981 – 1983              Orientierungsstufe Nordenham-Friedrich-August-Hütte  
1983 – 1990              Gymnasium Nordenham

## Hochschulausbildung

1990 – 1996              Studium der Physik an der *Carl-von-Ossietzky*-Universität in  
                              Oldenburg (Abschluss Diplom)  
1992                      Vordiplom Physik  
                              Prüfungen bei Prof. Dr. J. Luther (Experimentalphysik), Prof.  
                              Dr. A. Rauh (Theoretische Physik), Prof. Dr. B. Carl (Mathe-  
                              matik), Prof. Dr. Th. Höpner (Wahlpflichtfach Biologie (Bio-  
                              chemie))  
1994                      Studienarbeit in Angewandter Physik („Erprobung von Kre-  
                              sylviolett als roter Eichstandard“) unter der Anleitung von  
                              Dr. W. Tuszynski  
1995 – 1996              Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe Molekül- und Biophysik  
                              („Pflanzenstress durch Herbizide: Analyse der Photosynthe-  
                              seaktivität mit zeitaufgelöster Fluoreszenzspektroskopie“)  
                              Diplomprüfungen bei Prof. Dr. K. Maier (Experimentalphy-  
                              sik), PD Dr. L. Polley (Theoretische Physik), Prof. Dr. Th.  
                              Höpner (Wahlpflichtfach Biologie (Biochemie))  
seit April 1997            Promotion am Max-Planck-Institut für Biophysik in Frank-  
                              furt in der Abteilung Biophysikalische Chemie bei Prof. Dr.  
                              Ernst Bamberg  
                              („Untersuchungen zur Kinetik des  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chlorid-  
                              kanals und des  $\text{Na}^{+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers“)